

UNIVERSIDAD DE SONORA

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

**EVALUACION COMPARATIVA DE DOS METODOS:  
QUIMICO Y MICROBIOLOGICO PARA DETERMINAR  
LISINA DISPONIBLE EN ALIMENTOS**



QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACEUTICO  
BIOLOGO**

PRESENTA

**María Isabel Tapia López**

HERMOSILLO, SONORA, MEXICO

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## C O N T E N I D O

I.- INTRODUCCION	1
II.- GENERALIDADES	4
III.- MATERIAL Y METODOS	13
a).- Método Microbiológico	
b).- Método químico	
c).- Bioensayo	
IV.- RESULTADOS	22
V.- DISCUSION	35
VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
VII.- BIBLIOGRAFIA	40

I N T R O D U C C I O N

En la formulación de dietas eficientes para animales domésticos todos los esfuerzos están dirigidos a proveer cada nutriente en un nivel que favorezca el crecimiento ó producción óptima, lo que implica para los responsables de la manufactura de dichas dietas conocer el destino de los nutrientes individuales en el organismo. Esto significa que cada constituyente debe estar en una proporción adecuada y todos los componentes en un balance ideal uno con otro.

Actualmente en la formulación de dietas avícolas comerciales se dá considerable atención a la cantidad de aminoácidos individuales en la dieta. La información a este respecto se restringe a valores de contenido total de aminoácidos, establecidos por determinaciones químicas, mientras que la proporción de cada aminoácido que es disponible al ave para su metabolismo, no es conocida. Tal información es particularmente valiosa en vista de los considerables efectos de los métodos de procesamiento y almacenaje sobre la disponibilidad de los aminoácidos (12).

En vista de que la lisina es uno de los aminoácidos más importante en dietas avícolas pues impone una limitación en el crecimiento y desarrollo del

pollo, el presente trabajo tiene por objeto determinar la lisina disponible en alimentos para pollos, - estimada por métodos microbiológico y químico, haciendo una comparación de ambos mediante un bioensayo el cual se llevó a cabo utilizando el pollo como animal de experimentación.

GENERALIDADES

## PROTEINAS.

Las proteínas son sustancias orgánicas de elevado peso molecular formadas por aminoácidos, los cuales están unidos entre sí por enlaces peptídicos. A semejanza de los carbohidratos y grasas, las proteínas están compuestas de carbono, hidrógeno y oxígeno, pero difieren de los ejemplos típicos de estos compuestos, en que contienen además nitrógeno y a menudo azufre.

Las proteínas son los compuestos esenciales del protoplasma de las células de los animales y de las plantas. En las plantas la proteína es concentrada principalmente en aquellas regiones de crecimiento activo, como hojas y semillas. Las plantas pueden sintetizar sus proteínas a partir de compuestos relativamente simples como dióxido de carbono, agua, nitratos y sulfatos. Esta forma de vida representa una fuente original de proteínas.

En los animales las proteínas son los constituyentes principales de los órganos y de las estructuras blandas del organismo. Los animales en general no poseen la capacidad de las plantas para sintetizar proteínas a partir de compuestos simples, lo que los-

hace dependientes de éstas (17). Una fuente liberal y continua de proteína es esencial durante la vida del animal para el crecimiento, mantenimiento y reparación de sus tejidos. Esta notable capacidad de los animales para convertir sus proteínas ingeridas en otras diferentes y especializadas, es una fase vitalmente importante del proceso de nutrición.

El requerimiento de proteínas en la dieta no es solo cuantitativo sino que también existe un aspecto cualitativo importante, ya que el metabolismo de las proteínas se encuentra intrínsecamente relacionado con el de los aminoácidos que las constituyen. Ciertos aminoácidos son llamados indispensables, con lo cual se quiere significar que deben ser adicionados a la dieta debido a que el organismo animal es incapaz de sintetizarlos. Los llamados no indispensables, también son necesarios para el organismo, puesto que se encuentran en las proteínas de los tejidos, pero pueden ser sintetizados por el animal.

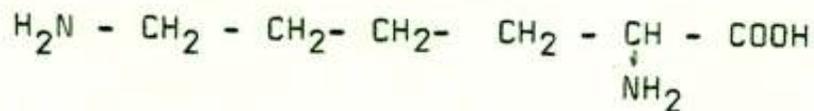
Los aminoácidos indispensables ó esenciales varían según la especie animal, es decir los indispensables para una especie no son necesariamente los mismos que requiere otra. Por ejemplo; estudios hechos en pollo, han mostrado que dos aminoácidos (glicina y ácido glutámico) que no son esenciales para la rata,

pueden serlo para éste. Los ruminantes son mucho menos definidos en sus requerimientos de aminoácidos esenciales que los animales monogástricos como el hombre, cerdo, rata y pollo. Los numerosos microorganismos del rumen del ganado, son capaces de sintetizar aminoácidos y proteínas a partir de los compuestos nitrogenados ingeridos. Debido a esas diferencias en los requerimientos de aminoácidos en las diferentes especies, es obvio que el término aminoácido indispensable tiene significación cuando se aplica a una especie animal particular y de una edad determinada.

#### LISINA

Un aminoácido se caracteriza por contener cuando menos un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) y un grupo carboxilo ( $\text{COOH}$ ) en su estructura química. El enlace peptídico se forma entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro aminoácido.

La lisina es un aminoácido básico alifático con el nombre químico de ácido alfa, epsilon diamino- caproico. Su estructura química es:



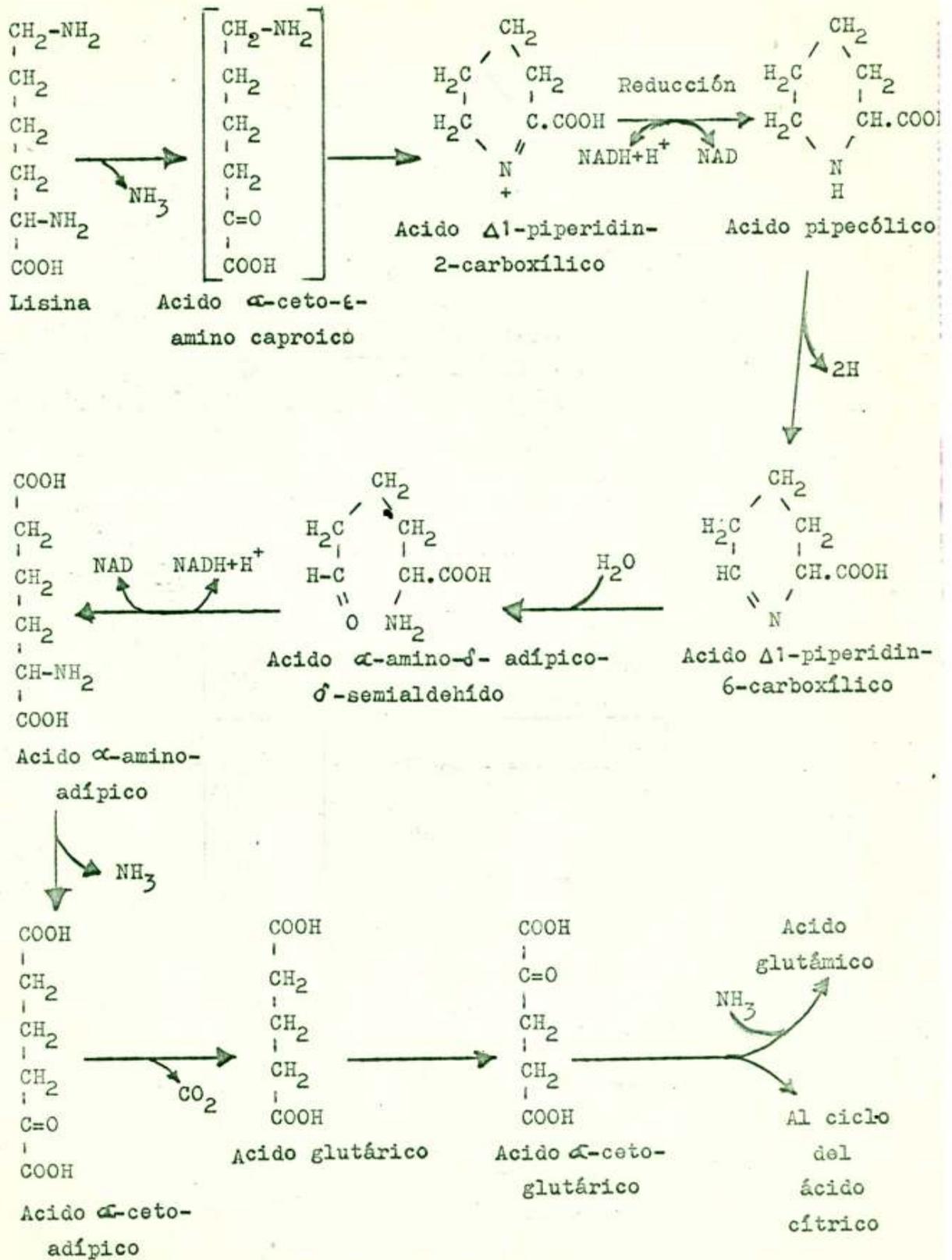
Dreschel (5) en 1889 aisló de un hidrolizado de caseína, precipitada con ácido fosfotúngstico, una sustancia que llamó lisatina, la cual después se vió que era una mezcla de lisina y arginina. Más tarde Dreschel (5) y sus colaboradores reportaron la preparación del dicloruro de una base, la cual fué indentificada como ácido diamino-caproico, pareciendo ser un homólogo de ornitina. Esto fué confirmado por Ellinger (7) quien obtuvo pentametilén diamina a partir de lisina por putrefacción anaeróbica. Su estructura fué establecida en 1902 cuando Fischer y Weigert (8) la sintetizaron a partir del éster cianopropil-malónico y demostraron que su producto era idéntico al constituyente racemizado obteniendo de proteínas. No fué sino hasta 1928 que la lisina fué obtenida como una base cristalina por Vickery y Leavenworth (19). La lisina fue uno de los primeros aminoácidos que se demostró su necesidad para el crecimiento de animales.

La lisina es un aminoácido ampliamente distribuido que existe en algunas fuentes de proteína en proporciones moderadamente altas. Los granos de cereales y subproductos de cereales generalmente son fuen-

tes pobres de lisina, mientras el pescado y subproductos animales son relativamente buenas fuentes de este aminoácido.

La lisina es un constituyente indispensable en la dieta del animal joven en crecimiento; es esencial también para el mantenimiento del equilibrio nitrogenado en el humano adulto.

No ha sido posible demostrar la síntesis de lisina en los animales superiores. Puede ser deaminada in vivo y así proveer nitrógeno para la síntesis de otros aminoácidos, pero no es regenerada. Su metabolismo por consiguiente involucra una deaminación oxidativa la cual es irreversible. El esquema que se muestra a continuación, basado en los estudios realizados en la rata, ha sido propuesto por Rothstein (1954, 1960) (11).



Desintegración metabólica de la lisina

El primer paso en la desintegración de la lisina que da como resultado la deaminación oxidativa del aminoácido en cetoácido, no ha sido probado aislando el cetoácido de la lisina (ácido alfa-ceto-epsilon-amino-caproico) probablemente a que es rápidamente convertido en una estructura cíclica, el ácido dehidropipecólico. Esta puede ser una razón para la incapacidad de la lisina de participar en la transaminación puesto que el cetoácido es rápidamente e irreversiblemente convertido en una molécula cíclica. Es por ello que los requerimientos nutricionales de lisina son altamente específicos ya que solo el L isómero y muy pocos derivados en los cuales el grupo amino ha sido sustituido, pueden ser utilizados (9).

Una deficiencia de lisina en la dieta generalmente causa una retardación en el crecimiento y pérdida del apetito. Estos síntomas de deficiencia no pueden ser considerados como únicos ya que son cualitativamente los mismos que los producidos por cualquier interferencia general con la síntesis de proteínas.

En la forma concluyente ha sido demostrado que la lisina de las proteínas corporales se deriva directamente de la lisina de la dieta, ya que las fuentes dietéticas de nitrógeno no pueden ser utilizadas en

la síntesis de lisina como pueden serlo para otros  
aminoácidos.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

## METODO MICROBIOLOGICO

El empleo de microorganismos para el ensayo de aminoácidos surgió como una consecuencia lógica después de su uso en la determinación de vitaminas. Wood et al., (20) fueron los primeros en sugerir que los microorganismos podrían ser usados para la determinación cuantitativa de aminoácidos. Sin embargo en ese tiempo (1940), no se tenía el conocimiento necesario de los requerimientos para el crecimiento de microorganismos adecuados para dicho ensayo. Usando 17 aminoácidos en lugar del hidrolizado ácido de caseína y un eluado de jugo de tomate como fuente de factores de crecimiento, Kuiken et al., (15). reportaron que 9 aminoácidos fueron esenciales para el crecimiento de Lactobacillus arabinosus 17-5, y que los aminoácidos: leucina, isoleucina y valina, podrían ser determinados cuantitativamente por técnicas microbiológicas similares a las previamente utilizadas para el ensayo de vitaminas. Esto se ha extendido a la determinación de 18 aminoácidos, con un buen grado de precisión, exactitud y especificidad.

Los métodos microbiológicos para determinar aminoácidos se basan en la observación de que algunos microorganismos con características bien definidas,

pueden multiplicarse y producir ciertos productos metabólicos únicamente en presencia de determinados aminoácidos cuando se cultivan en un medio nutritivo-óptimo.

En el presente trabajo las muestras a analizar fueron: harinolina (harina de semilla de algodón), harina de soya y harina de pescado comerciales, las cuales antes de ser ensayadas por este método, se sometieron a hidrólisis ácida previa, con HCl, 6N a temperatura de 121° C durante 12 horas, el término de las cuales el hidrolizado se neutralizó a pH 7 utilizando NaOH 6N (sol. acuosa).

El aminoácido a determinar fue lisina y el microorganismo usado para ello Leuconostoc mesenteroides ATCC 8042, el cual fué conservado en Micro Assay Culture Agar (DIFCO), (4), y resembrado en Micro Inoculum Broth (DIFCO) (4), para la elaboración del inóculo. El medio basal empleado para el ensayo fué lysina Assay Medium (DIFCO) (4).

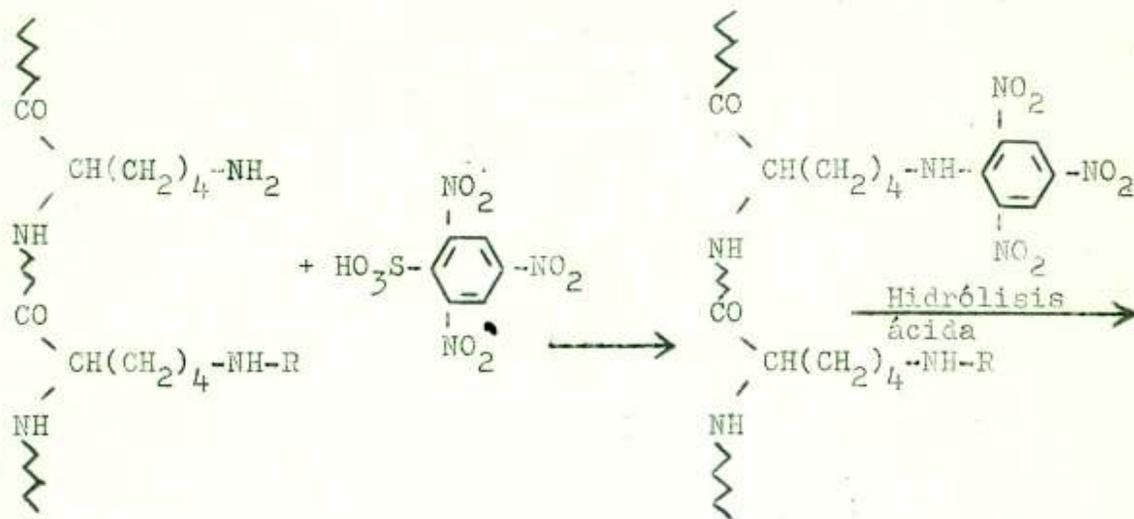
El método que se siguió fué el siguiente: se preparó medio basal conteniendo todos los constituyentes específicos y estimulantes requeridos por el microorganismo, con excepción del aminoácido que se ensayó. Alicuotas de las soluciones problemas, que se encon-

traban dentro del rango de ensayo, se colocaron en -- tubos de ensayo así como cantidades conocidas del es- tandard por triplicado, completando a un volumen de - terminado con agua, adicionándose enseguida el medio- basal. Posteriormente se esterilizaron durante 10 mi- nutos a 15 libras de presión, los tubos de la curva - estandard y los de las muestras,. Después sellevó - a cabo la inoculación según el método propuesto por - Kavanagh (13), incubándose enseguida las muestras pro- blemas y la curva estandard por un período de 72 horas de acuerdo con las recomendaciones de Barton-Wright ( 2), para el ensayo microbiológico de Lisina. la can- tidad del aminoácido presente en las muestras se cal- culó a partir de la curva estandard .

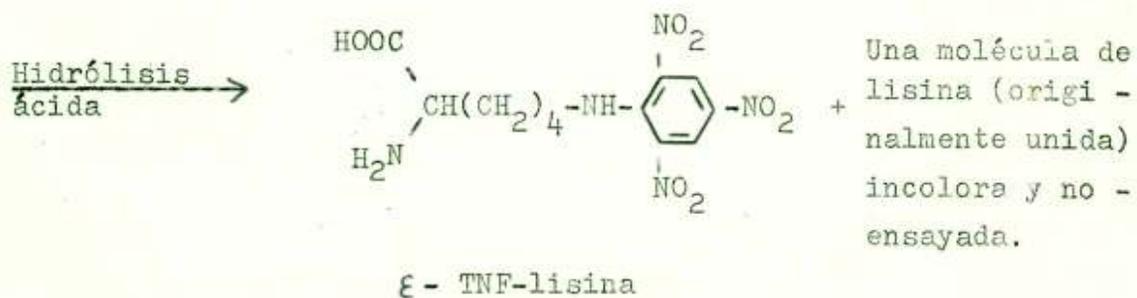
#### METODO QUIMICO.

Experimentos con proteínas purificadas sugieren- que la disponibilidad reducida de la lisina se debe - en gran parte a su grupo E-NH<sub>2</sub> combinado con otros - grupos activos, ya que bajo condiciones de calor hú é- medo forman una unión que resiste la hidrólisis enzi- mática (6). Esta hipótesis de que solo las moléculas- de lisina con grupos E-NH<sub>2</sub> reactivos son nutricionalmen- te aprovechables, es la base de un procedimiento desa- rrollado recientemente, en el cual el ácido 2,4,6, tri

nitro -bencén-sulfónico se hace reaccionar con grupos -NH<sub>2</sub> libres en la proteína intacta y la trinitro fenil lisina liberada por subsecuente hidrólisis ácida se mide colorimétricamente (16). El principio se ilustra a continuación:



Una molécula colorida de:



## BIDENSAYO

La multitud de caminos metabólicos involucrados en la utilización biológica de aminoácidos, hace muy difícil una evaluación de disponibilidad en términos absolutos. La función biológica más importante de los aminoácidos esenciales es, en términos cuantitativos, la síntesis proteica. Por consiguiente es claro que el bioensayo de un aminoácido esencial es mejor llevado a cabo en términos de la habilidad de promover la síntesis proteica y la evaluación de ganancia de nitrógeno corporal ( ó retención), es la medida más apropiada de síntesis. Sin embargo hay dificultades técnicas en la determinación de nitrógeno total corporal y balance nitrogenado, que reducen la utilidad potencial de tal procedimiento.

En los animales en crecimiento la acumulación de nitrógeno corporal está generalmente correlacionada con la ganancia en peso. Desviaciones a tal correlación se encuentran cuando hay un cambio en la composición corporal; por ejemplo en el contenido de grasa. Sin embargo esto no invalida el criterio de ganancia en peso como un índice indirecto de disponibilidad de aminoácidos, es decir, como un procedimiento estandar que mida la potencia de un material prueba, con

respecto a un patrón establecido (10).

Para llevar a cabo el bioensayo seleccionaron pollos de 6 días de edad, que habían sido alimentados con una dieta a base de soya-maíz antes de ser usados en este estudio. Al séptimo día se les suspendió el alimento durante la noche y al siguiente día, después de ser pesados individualmente, se distribuyeron de acuerdo con su peso, en 8 tratamientos, 5 de los cuales fueron asignados para establecer la curva de respuesta tipo y los 3 restantes a cada uno de los alimentos a probar. Los pollos así distribuidos fueron alimentados con las dietas experimentales por un período de 7 días. El alimento fué suministrado ad libitum y la ganancia en peso fué anotada diariamente así como el consumo del alimento.

Como ya se mencionó fué necesario obtener una curva de respuesta tipo, llevándose a cabo la incorporación del aminoácido prueba (lisina), en 5 niveles de la dieta basal dada a conocer por Dean y Scott (3) y que se muestra a continuación.

Dieta basal de aminoácidos cristalinos

Almidón de maíz	Var.
Mezcla de aminoácidos	Var.
Aceite de Maíz	15.00
Mezcla de Sales	5.37
Celulosa	3.00
NaHCO <sub>3</sub>	1.00
Cloruro de Colina	0.20
Vitaminas (2g/Kg) (14)	+
	<hr/>
	100.00

Harina de soya, harina de semilla de algodón y harina de pescado comerciales fueron las fuentes de proteína a ensayas, las cuales se adicionaron a la dieta basal en proporción de 5% de su contenido de proteína, evitando el aminoácido prueba. Estas adiciones fueron hechas a expensas del almidón de maíz. Sin embargo fué necesario adicionar una pequeña cantidad de lisina en forma cristalina a la dieta, a fin de llevar el crecimiento del pollo al segmento lineal de la curva de respuesta.

El contenido total de lisina de las fuentes de proteína se estableció por cromatografía, llevándose a cabo estas determinaciones en la Universidad de Arizona. La cuantificación de proteínas se hizo según el método Kjeldahl (1).

Los cálculos se basaron en el conocimiento de la composición química así como en el consumo de la proteína intacta durante los 7 días de la prueba. La can

1

41

idad del aminoácido consumido, que se expresó como crecimiento del pollo, fué determinado sustituyendo el aumento en peso en la recta obtenida.

La disponibilidad del aminoácido proporcionado por la proteína intacta se calculó suponiendo que el aminoácido suplementado fué utilizado 100% (18).

R E S U L T A D O S

A N A L I S I S      E F E C T U A D O S

to	Proteína (Nx6.25)	%Lisina (Cromatografía)	%Lisina (Met. microb.)	%Lisina (Met. c
de pescado	64.8	5.65	5.60	4.2
de soya	49.8	3.65	3.60	3.4
lina	43.1	2.00	1.95	1.8

RESPUESTA DE CRECIMIENTO A DIFERENTES NIVELES DE LISINA EN LA DIETA ESTANDARD

lisina	Aminoácido % de la dieta.	Aminoácido consumido (mg).	Aumento en peso, 7 días(g).	Ecuación de la recta obtenida
	0.45	139	25	
	0.55	233	38	
	0.65	411	53	$y=0.0867x+7.84$
	0.75	587	65	
	0.85	759	70	

CONSUMO Y DISPONIBILIDAD CALCULADA DE LISINA PROPORCIONADA POR  
 PROTEINA DE: HARINA DE SOYA, HARINA DE PESCADO Y HARINOLINA.

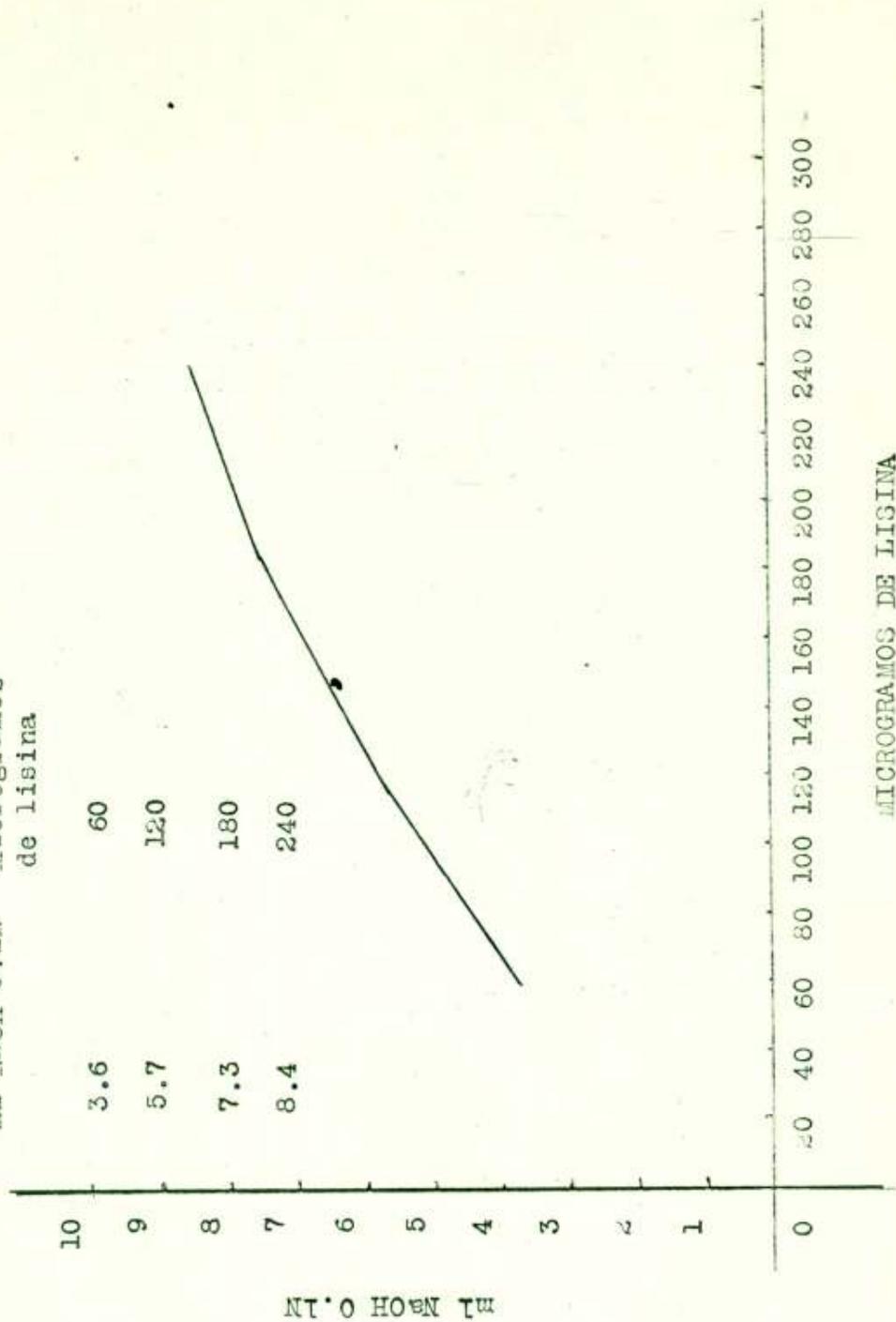
Prueba % (suplementado)	Proteína	Aumento en Pe- so, 7 días (g)	Proteína+A.A. suplementado. C.C.(mg).	Proteína solo CE(mg)	CC(mg)	D.E.B.	D.E.Q.
	H. pescado	75	774	356	433	82.2	75.7
	H. Soya	74	760	340	337	100.0	93.1
	Harinolína	44	416	145	140	100.0	93.0

- C.C. Consumo calculado sustituyendo el peso en la curva de respuesta estandard.
- CC Consumo calculado a partir de su composición química.
- CE Consumo experimental.
- D.E.B. % disponibilidad según ensayo biológico.
- D.E.Q. % disponibilidad según ensayo químico.
- D.E.M. % disponibilidad según ensayo microbiológico.

Muestra problema: harina de soya

ml NaOH 0.1N      Microgramos  
de lisina

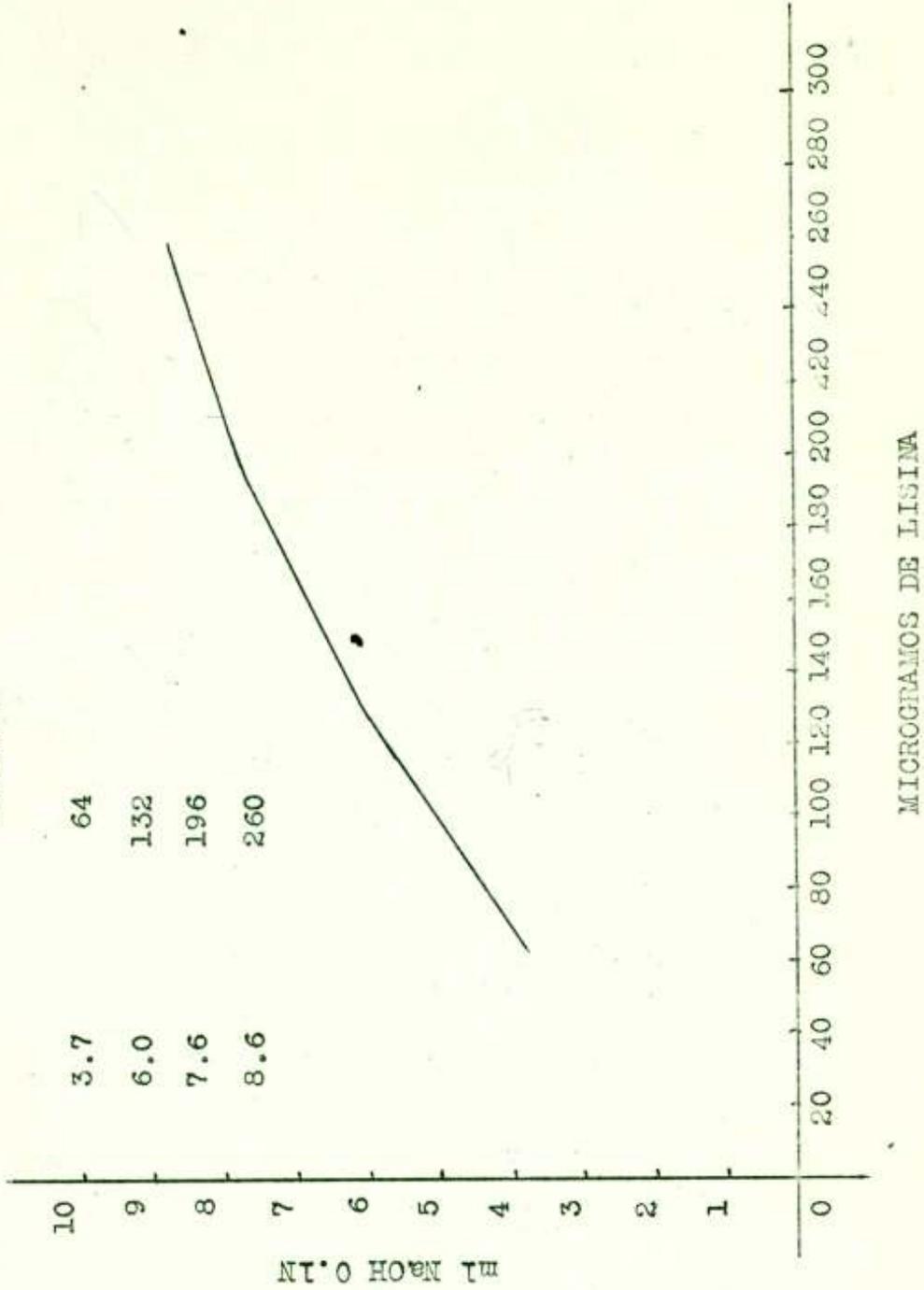
3.6	60
5.7	120
7.3	180
8.4	240



MICROGRAMOS DE LISINA

Muestra problema: harinolina

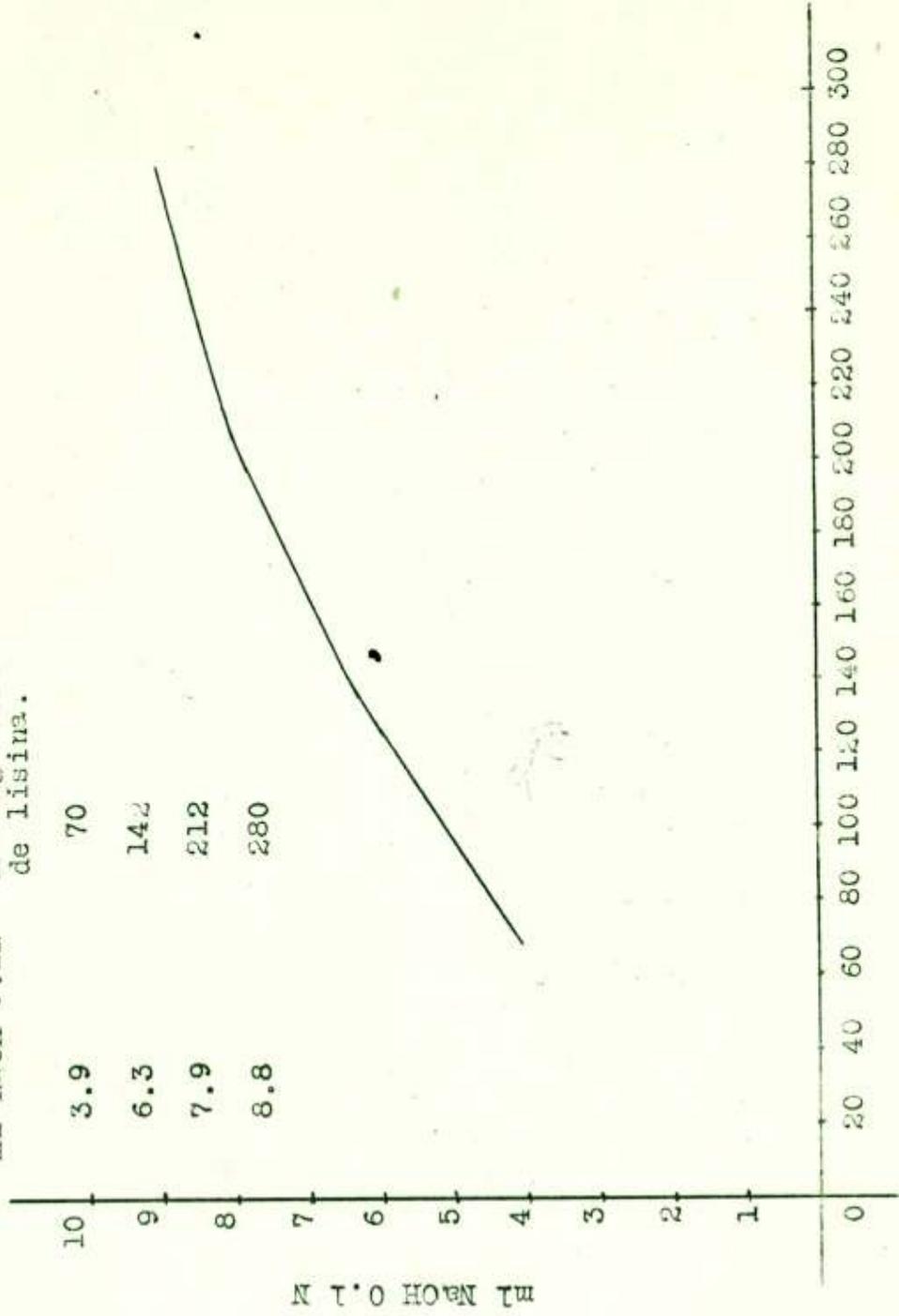
ml NaOH 0,1N Microgramos de  
lisina.



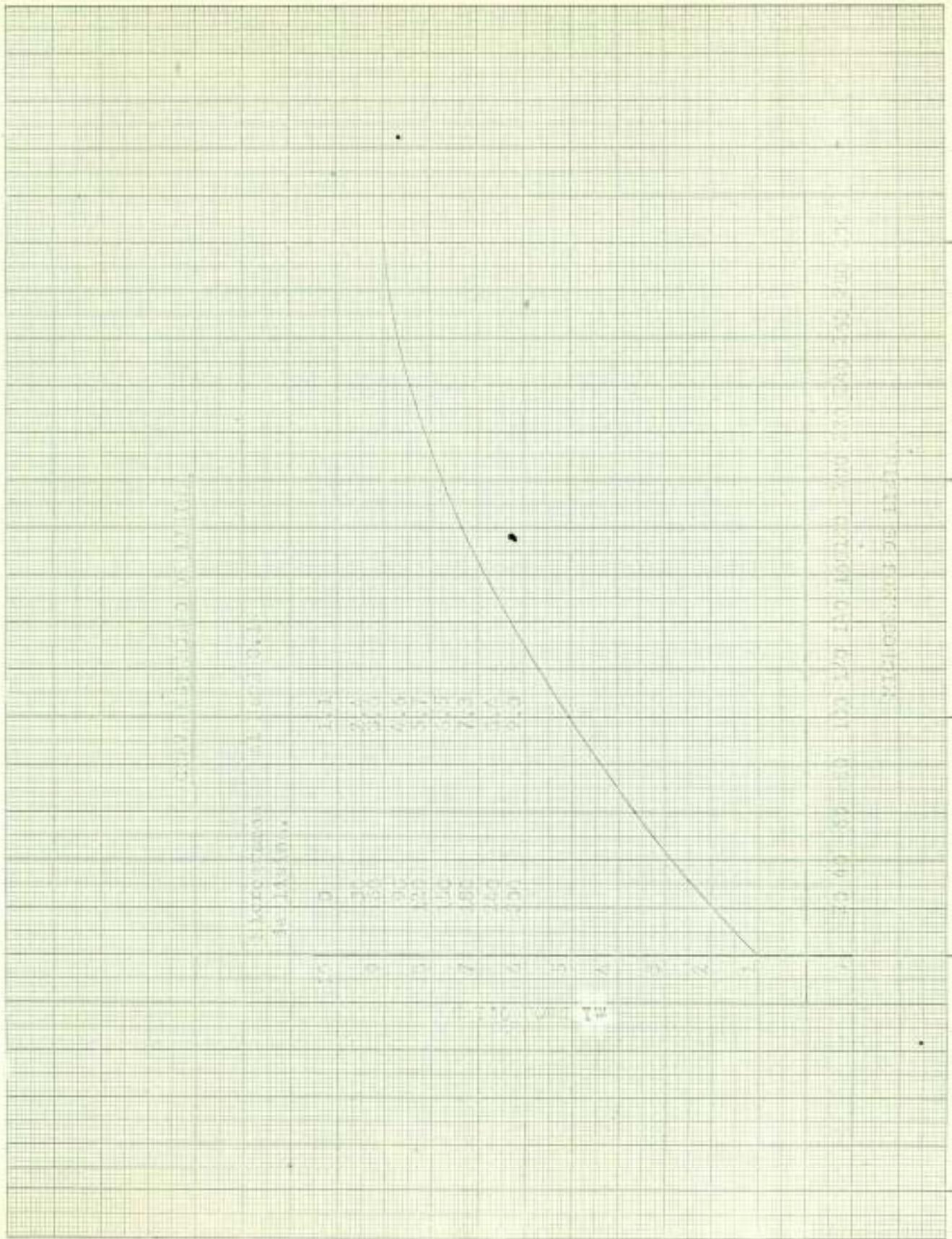
Muestra problema: harina de pescado

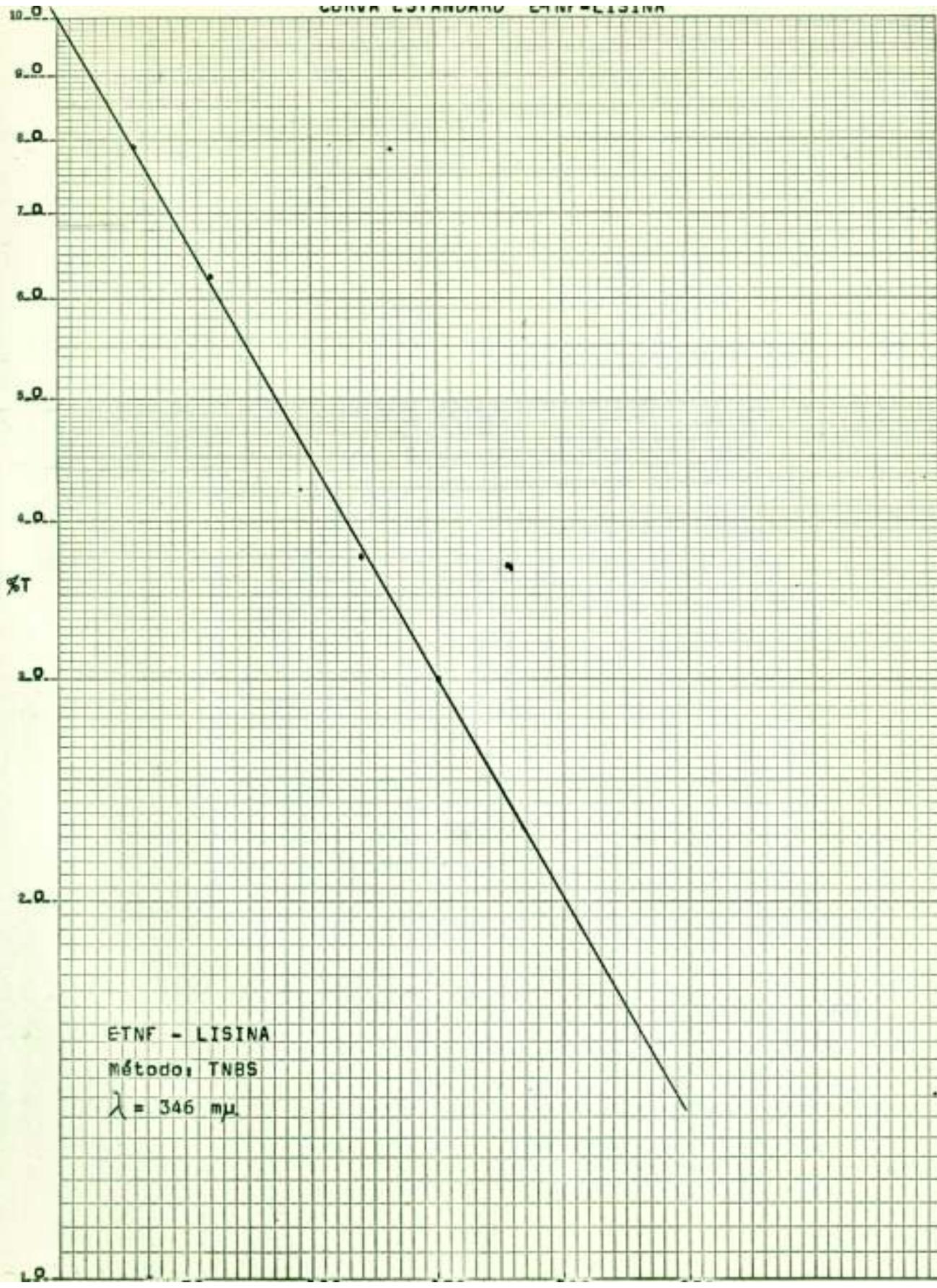
ml NaOH 0.1N      Microgramos  
de lisina.

3.9	70
6.3	142
7.9	212
8.8	280



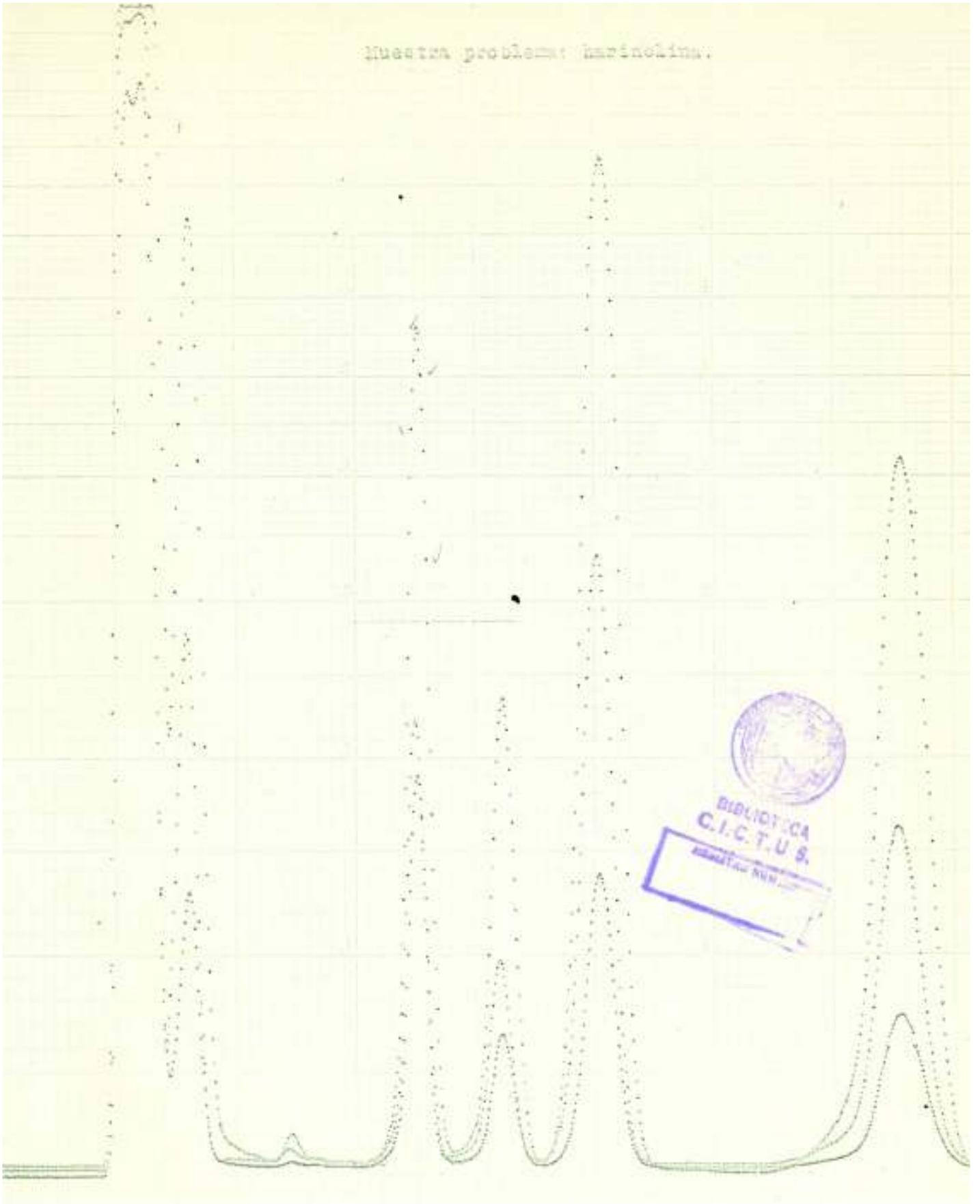
MICROGRAMOS DE LISINA



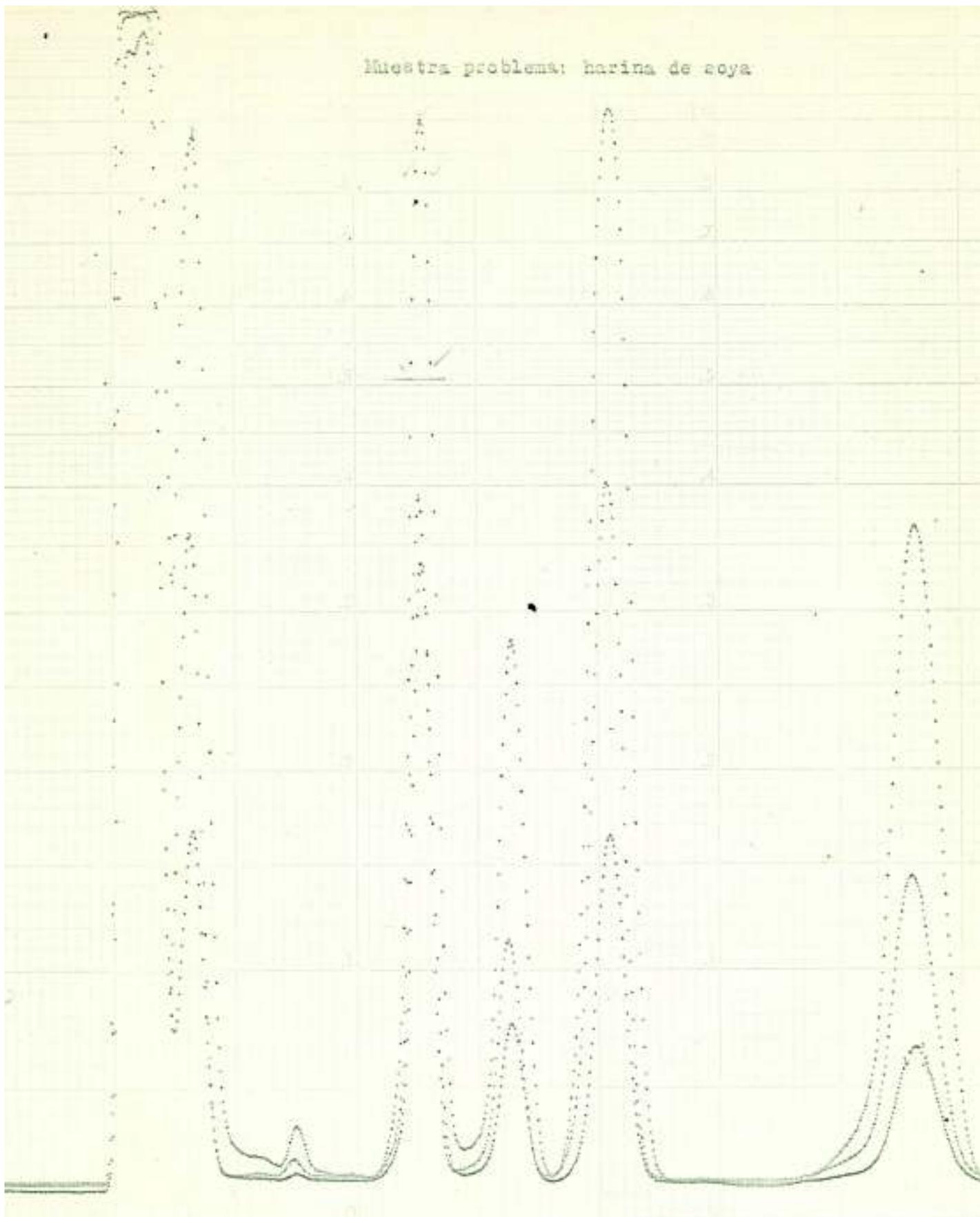


ETNF - LISINA  
Método: TNBS  
 $\lambda = 346 \text{ m}\mu$

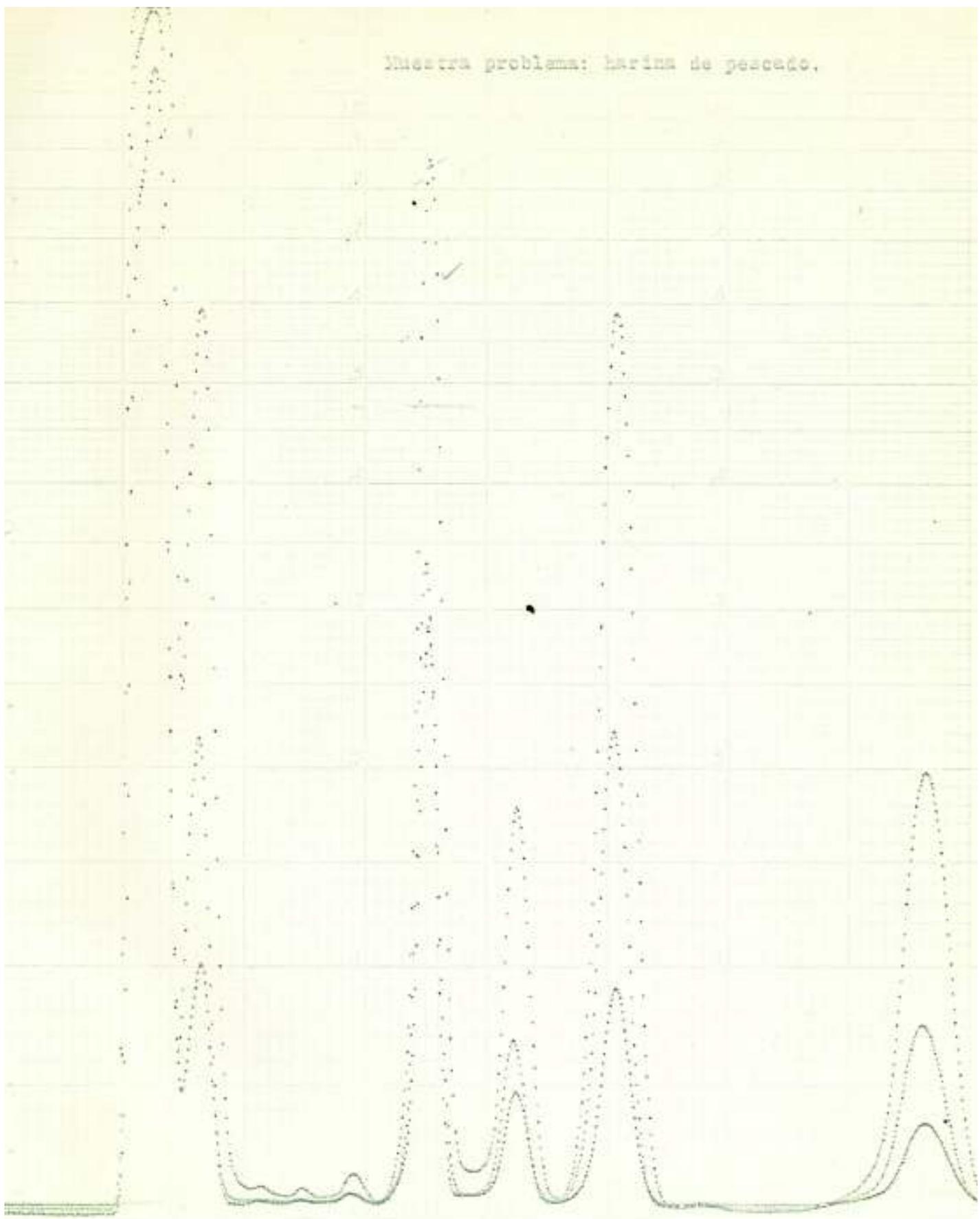
Muestra problema: marfanina.



Muestra problema: harina de soya



Muestra problema: harina de pescado.



Cantidad de Mismo  
calculado (kg)

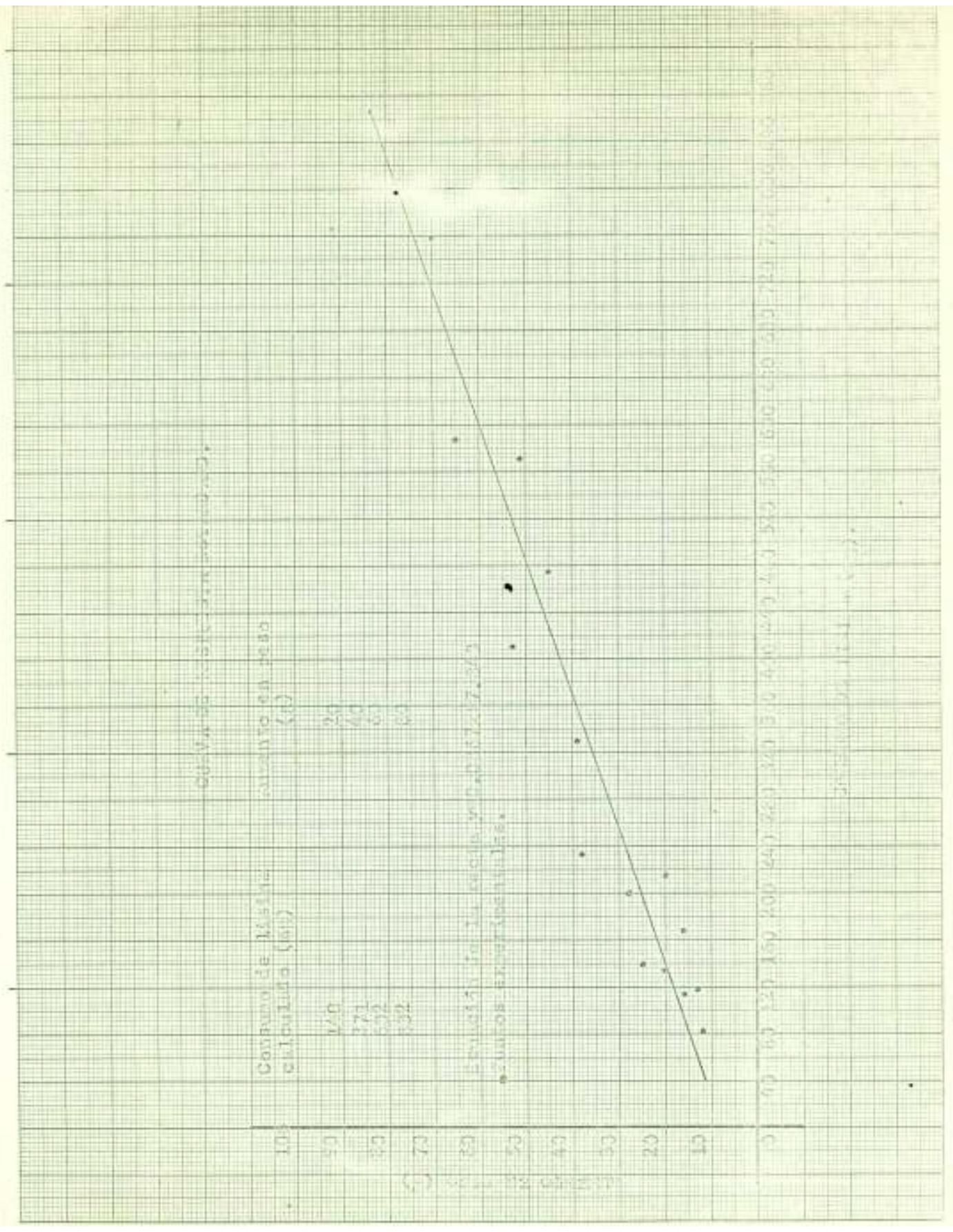
170  
171  
172  
173

Cantidad de Mismo  
calculado en peso

20  
20  
20  
20

Gráfica de la relación entre los  
Cálculos experimentales

Gráfica de la relación entre los  
Cálculos experimentales



D I S C U S S I O N

Por el método microbiológico y tomando en cuenta la fisiología del microorganismo usado se esperaba - lograr la cuantificación de lisina disponible ya que es sumamente específico y sensible a la L lisina que como se demostró anteriormente es la forma utilizable ó disponible de este aminoácido.

Sin embargo no se consideró que al hacer la - hidrólisis ácida previa de la muestra, se romperían - los enlaces de lisina formados con otros grupos reactivos diferentes de los grupos aldehídos, lo cual también constituye un criterio de disponibilidad ya que cuando dicho aminoácido se encuentra unido a otros - grupos reactivos de otros aminoácidos se reduce la - disponibilidad de la lisina a las enzimas y por lo - tanto al animal. El aminoácido así unido puede ser - regenerado por digestión ácida de la proteína y por - consiguiente no es destruido químicamente.

Al hacer la hidrólisis ácida solo se tomó en - cuenta el enlace formado entre la lisina y el grupo - aldehído de los carbohidratos, puesto que este enlace representa una pérdida química permanente, debido a que el aminoácido así unido no es regenerado por - hidrólisis química ni por las enzimas.

Aún cuando por el método químico se cuantificó -

aparentemente la mayor parte de lisina disponible no -  
se puede considerar que sea un valor real puesto que -  
se cuantifica la cantidad de lisina con el grupo -  
E-NH<sub>2</sub> libre y no se toman en cuenta otros criterios a-  
cerca de la disponibilidad.

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en el trabajo experimental se puede concluir lo siguiente:

a).- Por el método microbiológico empleado se detectó el contenido total de L. lisina.

b).- El método químico no detectó el contenido total de lisina sino únicamente la lisina con el grupo  $E-NH_2$  libre.

c).- El método microbiológico es más exacto y sensible, no obstante se corre el riesgo de sobreestimar la lisina disponible en las muestras que no contienen una cantidad apreciable de carbohidratos.

d).- El método químico es menos laborioso, sin embargo se requiere más equipo.

e).- La carencia de exactitud del método químico puede representar elevación de costos a escala industrial.

#### RECOMENDACIONES.-

Por lo anterior, si el trabajo exige gran exactitud, el método a elección es el microbiológico. Si no se dispone del equipo adecuado el método microbiológico sigue siendo el de elección.

✓ Para obtener un valor real de lisina disponible en las muestras que contienen pocos carbohidratos se recomienda hacer una hidrólisis enzimática de la muestra.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- A.O.A.C.- Official Methods of Analysis., 10th, -  
Ed., Association of Official Agricultural Chemist,  
Washington, D.C.- Pag. 56.- 1965.
- 2.- Barton-Wright., Practical Methods for the Micro-  
biological Assay of the Vitamin B-Complex and Ami-  
no Acids., United Trade Press., L.T.D., London., -  
Pag.41.
- 3.- Dean y Scott.- The Development of an Amino Acid -  
Reference Diet for the Early Growth of Chicks., -  
Poultry Sci, 44:803; (1965).
- 4.- Difco., Microbiological Assay of Vitamins and Ami-  
no Acids., Difco laboratories., Michigan U.S.A., -  
Pags. 15.67., (1964)
- 5.- Dreschel., Citado en Amino Acids and Proteins., -  
Greenberg., 1a. ed., Charles C. Thomas, publisher  
Springfield., Illinois, U.S.A., pags. 14 (1951).
- 6.- Eldred & Rodney., Citados en Chemical Methods of-  
Evaluating Protein Quality., Carpenter, K.J. -  
Proc. Nutr. Soc., 17:91-100 (1958).
- 7.- Ellinger., Citado en Amino Acids and Proteinas., -  
Greenber.1a. ed., Charles C. Thomas, publisher, --  
Springfield, Illinois. U.S.A., Pags, 14 (1951).
- 8.- Fischer y Weigert., Citados en Amino Acids and --  
Proteins., Greenberg., 1a.Ed., Charles C. Thomas-

- publisher, Springfield., Illinois, U.S.A., pags. -  
14 (1951.-
- 9.-Greenberg. D.M., Amino Acids and Proteins., 1a. -  
ed., Charles. C. Thomas, publisher, Springfield, -  
Illinois. U.S.A., Pags. 590-592. (1951.)
- 10.-Guttridge., D.G.A., and Lewis D., Chick Bio-Assay-  
of Methinine and Cystine., Brit. Pult. Sci., 5:99-  
111. (1964).
- 11.-Harper H.A., Manual de Química Fisiologica., 1a. -  
ed., El Manual Moderno. S.A., México Pags., 284 -  
285., (1965).
- 12.-Henry y Kon., Citados en Recent Advances in Animal  
Nutrition, Abrams. J.T., 1a. ed., Little Brown and-  
Co., Boston., Pag. 131., (1966).
- 13.-Kavanagh F., Analytical Microbiology., 2a. ed., A-  
cademic Press New York., Pags., 636-637., (1969).
- 14.-Klain, G.J., Scott. H.M. and Johnson B.C., The Ami-  
no Acid Requeriment of the Growing Chick Fed ad -  
Crystalline Amino Acid Diet., Poultry Sci., 39:39-  
44. (1960).
- 15.-Kuiken et al., Citado en Analytical Microbiology.,  
Kavanagh. F., 2a. ed., Academic Press New York., -  
(1969).
- 16.-Liener I.E. and Kakade M.L., Determination of Avai-  
lable Lysine in Proteins., Anal. Biochem. 27:273--  
280 (1960)

- 17.- Scott M.L., Nesheim M.C., and Young R.J., Nutrition of the Chicken., 1a. ed., M.L. Scott & Associates., New York., Page 56., (1969).
- 18.- Smith. R.E., Assesment of the Availability of Amino Acids in Fish Meal., Soybean Meal and Feather-Meal by chick Growth Assay., Poultry Sci., 47:1624-1630., (1968).
- 19.- Vickery y LeavanWorth., Citados en Analytical Microbiology., Kavanagh F., 2a. ed., Academic Press New York., Pags. 636-637., (1969).
- 20.- Wood et. al., Citado en Analytical Microbiology., Kavanagh F., 2a. Ed., Academic Press New York., (1969).