

Tesis de Posgrado

Métodos microbiológicos para la determinación cuantitativa de la riboflavina

Rossi, Ana Zelmira

1948

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rossi, Ana Zelmira. (1948). Métodos microbiológicos para la determinación cuantitativa de la riboflavina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0572_Rossi.pdf

Cita tipo Chicago:

Rossi, Ana Zelmira. "Métodos microbiológicos para la determinación cuantitativa de la riboflavina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1948. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0572_Rossi.pdf

MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA DETERMINACION
CUANTITATIVA DE LA RIBOFLAVINA

por

ANA ZEIMIRA ROSSI

Tesis presentada para optar al título de
doctera en química en la Facultad de
Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
de Buenos Aires.

- 1948 -

Tesis: 372

Al Dr. Alfredo Sardelli por los útiles consejos
y valiosa dirección con que me ha honrado, todo
mi agradecimiento.

DETERMINACION MICROBIOLOGICA DE LA RIBOFLAVINA

CAPITULO I INTRODUCCION

El conocimiento de la existencia de sustancias esenciales para el mantenimiento de la vida, el crecimiento y la multiplicación de los seres vivientes fué realizado por la observación de hechos ocurridos en la naturaleza y luego y principalmente por el método experimental.

Es tan importante el empleo de este método que ha permitido en algunos casos conducir al hallazgo de sustancias que se encuentran en cantidad relativamente grande tal como sucedió con la treonina que es un amino-ácido importante en la constitución de la caseína y de muchas otras proteínas.

Los métodos:

La metodología obedece a principios relativamente sencillos y consiste en establecer condiciones óptimas para que un determinado fenómeno (por ejemplo crecimiento de un animal o vegetal) se lleve a cabo y luego modificar, en general por eliminación, cada uno de los distintos elementos que forman parte del sistema que define a esas condiciones óptimas.

Por éste o semejantes métodos fueron hallados los cuerpos esenciales dichos más arriba. Sin embargo la técnica es difícil, larga y costosa. Bastaría en pensar que la "uniformidad" de los animales de experiencia es esencial y que esto es prácticamente imposible por razones de las circunstancias que rodean la génesis del animal y por razones más fundamentales como son las genéticas.

La variación individual no puede ser excluida y solo el uso de un número grande de animales, permite compensar los errores debidos a esa variación. Además bastará con observar los valores de la desviación standard que se obtienen en grupos relativamente numerosos de animales para apreciar las dificultades que deben existir cuando se quieren hacer determinaciones cuantitativas. Esta simple enunciación bastaría para justificar la búsqueda de nuevos procedimientos o el empleo de distintas especies animales o vegetales para hacer más exactos, rápidos y menos costosos los procedimientos para la determinación de sustancias esenciales.

Así, por ejemplo, los métodos microbiológicos resultan ciertos y sencillos y pueden ser practicados con elementos fáciles de encontrar en cualquier laboratorio.

ENUMERACION DE LAS VITAMINAS DEL COMPLEJO B:

Las vitaminas o factores esenciales que constituyen el grupo hidrosoluble son relativamente numerosos; más abajo se da una idea de ellas y sus propiedades.

Tiamina (1):

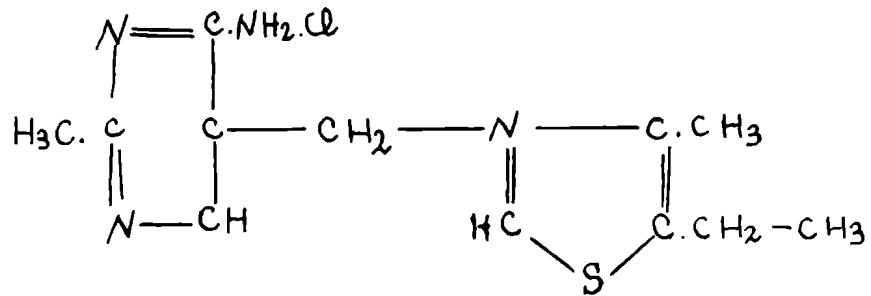
Forma parte de una coenzima, la cocarboxilasa, interviniendo en la utilización de los hidratos de carbono. Mantiene y estimula el apetito e interviene en el funcionamiento normal del intestino. Actúa sobre el sistema nervioso. Su falta en la alimentación produce una enfermedad conocida con el nombre de beriberi.

Conocida también con el nombre de aneurina o vitamina B₁, es destruida a altas temperaturas. Sensible a los álcalis. Des-

trufada por la acción del sulfite.

Se encuentra muy difundida en los tejidos tanto del reino animal como del reino vegetal.

La fórmula química de la tiamina es la siguiente:



Riboflavina:

Pertenece a un sistema enzimático, relacionado con el metabolismo de los hidratos de carbono y la purina. En este grupo de enzimas el grupo prostético puede estar formado de dos distintas formas, a saber: riboflavina mononucleótida y dinucleótida. Es un derivado de la iscalloxazina, con dos grupos metilos y una molécula de d-ribosa.

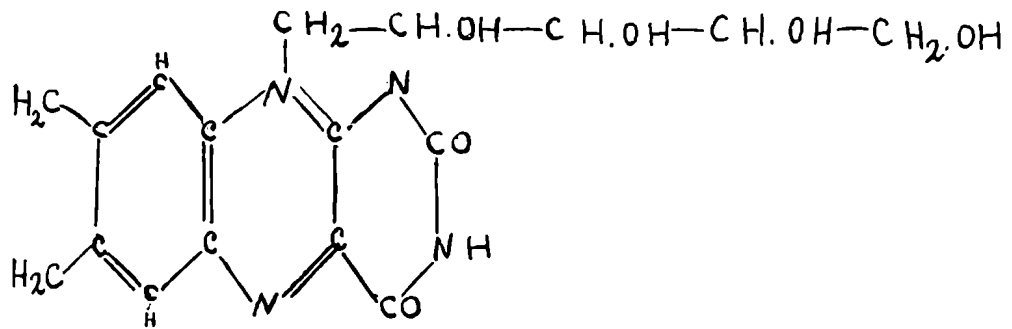
Se le ha dado el nombre de vitamina G, lactoflavina, o-vo flavina, vitamina B₂, y riboflavina, siendo más conocida por los dos últimos nombres.

Es muy estable al calor. Ocurriendo todo lo contrario cuando se la deja expuesta a la acción de la luz. Produce una fluorescencia amarillo-verdosa muy intensa. En solución alcalina la luz la descompone muy rápidamente.

Está relacionada con la respiración de los tejidos. Es esencial en el crecimiento normal.

Su falta en la alimentación produce neuritis, defectos visuales, falta de peso, debilidad, etc.

Su fórmula química es la siguiente:



Acido pantoténico: (1)

Está asociado a un sistema enzimático. Su falta en la alimentación produce dermatitis, aparecen lesiones típicas de la piel el sistema nervioso y endocrínico también son alterados.

Es conocido también con el nombre de factor antidermatitis.

Es estable al calor, se destruye fácilmente bajo la acción tanto de los ácidos como de los álcalis.

Su fórmula química es la siguiente:



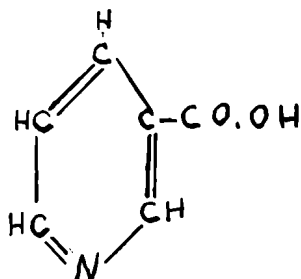
Acido nicotínico:

Forma parte de dos sistemas enzimáticos muy importantes: coenzima I y coenzima II; las dos intervienen en la respiración de los tejidos.

Es la más estable de las vitaminas hidro-solubles. No es afectada por la acción de los álcalis ni de los ácidos, ni tam-

ce por el calor. Su falta en la alimentación produce la pelagra (7), (8).

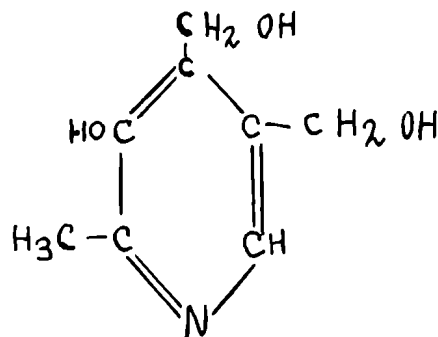
Su fórmula química es la siguiente:



Piridoxina: (3)

Interviene en el metabolismo de los ácidos grasos y probablemente en la síntesis de las grasas a partir de las proteínas. Se encuentra combinada a las proteínas y al almidón (9), (10).

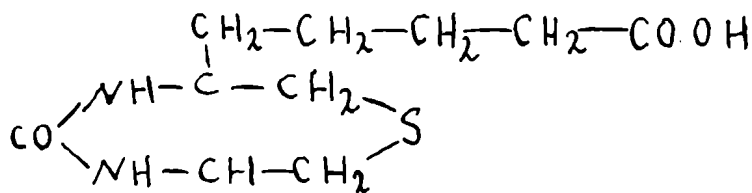
Su fórmula química es la siguiente:



Biotina: (2), (11)

Se encuentra distribuída tanto en el reino vegetal como en el animal. Es una substancia sumamente activa. Su falta en la alimentación produce enfermedades en la piel.

Su fórmula química es la siguiente:

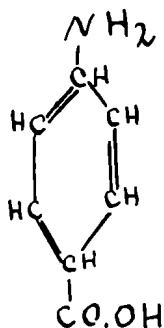


Acido p-amino benzoico:

El ácido p-amino benzoico (13) se encuentra distribuído en el reino animal y vegetal. Se puede aislar en forma libre o combinada.

La falta de esta substancia en la alimentación de algunos animales produce la acromotriquia.

Su fórmula química es la siguiente:

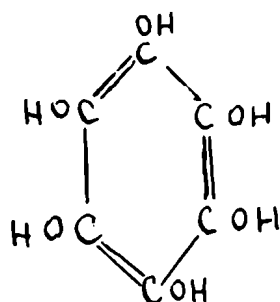


Inositol:

Se encuentra en los tejidos y fluidos humanos. Influye en los movimientos peristálticos del intestino.

Su falta en la alimentación de las ratas produce la caída del cabello; el hígado también es atacado, se hincha y su análisis acusa un contenido de colesterol muy grande.

Su fórmula química es la siguiente:



Acido fólico:

Substancia muy activa que se encuentra abundantemente

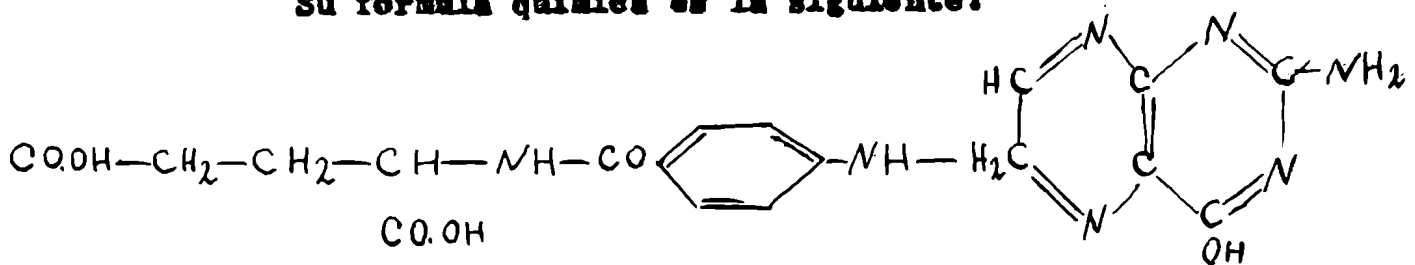
en la levadura de donde fué aislada por primera vez.

También está presente en las substancias grasas y en el hígado.

Se lo conoció con el nombre de "factor del Lactobacillus casei".

La falta del mismo en el alimento de los pollos ocasiona una anemia muy seria.

Su fórmula química es la siguiente:



MÉTODOS BIOLÓGICOS PARA LA DETERMINACION DE LAS VITAMINAS
DEL COMPLEJO B.

A continuación describiremos someramente alguno de los métodos usados corrientemente para la determinación de estas vitaminas, por considerarlos representativos. Ellos justificarán la razón de lo expuesto antes.

Determinación cuantitativa de la tiamina:

Esencialmente consiste en mantener ratas jóvenes de alrededor de 4 semanas, bajo dieta carente de tiamina, pero con la presencia de todos los otros factores necesarios. Esto tiene por objeto agotar todas las reservas de la vitamina en estudio.

Luego a un grupo de ellas se le administra gradualmente cantidades conocidas del producto en ensayo, a otro se le da cantidades conocidas de tiamina pura, mientras que a unas pocas ratas se las mantiene con la dieta inicial sirviendo así como controles negativos.

Estas últimas permiten demostrar los efectos de una dieta carente de tiamina administrada continuamente.

La tiamina presente en el producto en ensayo se puede evaluar por comparación observando los aumentos de peso que experimentan los dos primeros grupos de ratas durante un período de tres a seis semanas.

El promedio del peso ganado por el grupo de ratas en cuya alimentación está presente la tiamina pura se considera proporcio-

nal a la cantidad de vitamina. Pudiéndose hacer una curva del peso ganado por los animales en función de la tiamina dada (4).

Determinación cuantitativa de la riboflavina:

Se usa el mismo método que para la determinación de la vitamina anterior con la diferencia que se elimina de la dieta únicamente la riboflavina dejando todos los otros factores que son necesarios.

Determinación cuantitativa del ácido pantoténico:

El ensayo biológico que se efectúa corrientemente se basa en la observación de la dermatitis que se manifiesta en los pollos cuando se los somete a una dieta pobre en ácido pantoténico y en su respuesta cuando en esa dieta se incluye cantidades conocidas de ácido pantoténico. (6)

También puede determinarse por el aumento de peso que experimentan distintos grupos de ratas durante un período de 5 semanas cuando en la alimentación está presente dicha vitamina.

Determinación cuantitativa del ácido nicotínico:

Los métodos biológicos para la determinación cuantitativa del ácido nicotínico son malos. Pueden utilizarse perros (14, 15) y pollos. En los primeros, su falta en la alimentación produce lo que se conoce con el nombre de lengua negra.

Determinación cuantitativa de la piridoxina:

El método biológico da resultados poco satisfactorios, por faltarle especificidad. Para el ensayo se utilizan ratas. (16) (17).

Determinación cuantitativa de la biotina:

Se utilizan ratas albinas y se les dá como fuente única de proteínas clara de huevo (18). El método es muy largo porque los primeros síntomas aparecen en la piel recién después de 5 o 7 semanas. También se ha ensayado un método de observación del crecimientos de las ratas. (19)

Determinación cuantitativa del ácido p-amino-benzoico:

Los métodos biológicos no son muy buenos; se basan en la cura o prevención de la acrometriquia en las ratas. También puede observarse el crecimiento de los pollos. (20)

Determinación cuantitativa del inositol y ácido fólico:

Los métodos biológicos para la determinación de estas vitaminas son muy malos y no se utilizan.

CAPITULO II

LAS BACTERIAS Y SU COMPORTAMIENTO FRENTE A LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

En los últimos años se presentó la necesidad de disponer de métodos cortos y sobre todo prácticos para la determinación de las vitaminas y factores de crecimiento.

Los estudios han sido fructíferos y actualmente se pueden determinar con mucha exactitud varios de los componentes del complejo vitamínico B, por los métodos microbiológicos, dejando de lado a los métodos biológicos con todos sus inconvenientes.

Algunos microorganismos requieren para su metabolismo y crecimiento un cierto número de vitaminas y amino ácidos y utilizan una cantidad mayor que la necesaria que los animales superiores para igual cantidad en peso.

Cuando se obtuvo la tiamina al estado puro, recién se pudo estudiar de manera correcta los requerimientos de dicha vitamina por los microorganismos. Tatum, Veed y Peterson (21) demostraron que ciertas bacterias lácticas y propiónicas crecían mucho mejor en su presencia. Desde entonces se hicieron numerosos estudios, muy fructíferos, acerca del comportamiento bacteriano frente a sustancias del complejo vitamínico B.

La metodología se basó en casi todos los casos en la determinación de la aceleración del crecimiento de las bacterias o de sus actividades metabólicas, por adición de la vitamina (u otra sustancia según el caso) a medios de cultivos preparados especialmente para que la bacteria creciera muy difícilmente o no creciera cuando carecía de la sustancia que se investigaba.

Como es de imaginarse en la preparación de los medios de cultivo hubo que tener especial cuidado en la selección de los componentes así como también en la elección de las fuentes de donde provenían las sustancias, pues pequesísimas cantidades de impurezas (cuya presencia se ignora), pueden permitir el crecimiento de la bacteria y conducir a una concepción errónea de los requerimientos nutritivos de la bacteria.

Las sustancias requeridas por las células cuando no participan directamente en los procesos de producción de energía libre, pueden serlo en cantidad relativamente muy pequeña, tanto si participan de la constitución de sustancias que forman el cuerpo celular, cuanto de las que forman el cuerpo celular son parte de sistemas enzimáticos, de modo que la velocidad de las reacciones en que participan puede ser muy grande.

Esas sustancias pueden ser:

- a) sintetizadas por la célula en cantidad tan pequeña que es prácticamente despreciable.
- b) cuando esa velocidad de síntesis es de un grado mayor aunque insuficiente.
- c) por último cuando la velocidad de síntesis es tan grande que excede los requerimientos de la célula.

A continuación se da el nombre de algunas sustancias que son sintetizadas por ciertas bacterias lácticas en cantidad tan pequeña que resultan prácticamente despreciables, pero que deben estar presentes en el medio, porque de lo contrario no se produce nin-

gún crecimiento bacteriano. Estas sustancias cuya presencia en el medio es fundamental se denominan "factores esenciales del crecimiento", "vitaminas" o "nutrientes esenciales".

Tabla 1

<u>Factores esenciales</u>	<u>Organismos</u>	<u>Referencias</u>
Riboflavina	<i>S. lactis</i>	Orla-Jensen (1936)
	<i>S. casei</i>	Snell, Strong, y Peterson (1937), (23).
Acido pantoténico	<i>L. casei</i>	Snell, Strong y Peterson (1938), (24).
Acido nicotínico	<i>L. casei</i>	Snell, Strong y Peterson (1938), (24).
Biotina	<i>L. plantarum</i>	Moeller (1939) (25).
	<i>L. arabinosus</i>	Snell y Wright (1941) (26).
Piridoxina	<i>L. plantarum</i>	Moeller (1938), (27).
Tiamina	<i>S. lactis</i>	Niven (1944), (28).
	<i>L. fermentum</i>	Sarett y Cheldelin (1944) (29).
Acido p-amino benzoico	<i>L. arabinosus</i>	Isbell (1942), (30).
Acido fólico	<i>L. casei</i>	Snell y Peterson (1939) (1940) (31) (32).
	<i>S. faecales</i>	Mitchell, Snell y Williams (1941) (33).

Cuando se establece como " factores esenciales del crecimiento " a una substancia, no es suficiente identificarla química - mente sino que es preciso ver con que proceso celular está relaciona - da y la acción que tiene en el mismo.

Así por ejemplo factores como: riboflavina, tiamina y ácido nicotínico se han conocido como componentes importantes de sis - temas enzimáticos y es muy probable que estén relacionados con la función metabólica.

Según Woods, (22) se pueden hacer las siguientes ex - periencias para solucionar el problema.

- a) Comprobar que un componente aislado de su sistema enzimáti - co es idéntico a un factor de crecimiento conocido.
- b) Estudiar el metabolismo de los microorganismos que crecen en un medio deficiente del factor en cuestión, y seguir detalla - damente la inversa de todo proceso metabólico que resulte a - fectado.
- c) Usar substancias generalmente análogas al factor (antimeta - bólicas) que puedan producir una inhibición específica del mismo.
- d) Estudiar el metabolismo del factor solo, y su relación con otros procesos metabólicos de la célula.
- e) En el caso de encontrarse que el factor puede reemplazarse por una substancia (x), químicamente distinta, puede dar lu - gar a que se piense que el factor interviene en la síntesis de (x) o vice-versa.

CAPITULO III
METODOS MICROBIOLOGICOS PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA
DE LAS VITAMINAS DEL COMPLEJO B.

El uso cada vez más frecuente de las vitaminas del grupo B y sobre todo la necesidad de conocer su metabolismo, hacen sin duda inadecuados los métodos enumerados.

La observación de que ciertas bacterias requieren para su multiplicación y para el desarrollo normal de su metabolismo alguna de las vitaminas del grupo B, dió fundamento a la idea de utilizarlas en sustitución de los animales de experiencia.

Es evidente que para saber que una vitamina es esencial para una bacteria se requiere el uso de métodos semejantes a los que fueron utilizados para el caso de los animales. Además es necesario juzgar con mucho cuidado los resultados para el caso de que se emplean mezclas complejas de substancias entre las cuales la vitamina se encuentra en muy pequeña proporción.

Si los métodos fundados en el uso de las bacterias están garantizados contra el error por una metodología adecuada, no hay duda que resuelven la mayor parte de las dificultades que presenta el empleo de los animales.

A continuación enumeraré y describiré sucintamente el uso de las bacterias para el caso de las vitaminas del grupo B.

Ensayo microbiológico para la determinación de la tiamina:

En un principio se utilizó para la determinación microbiológica de la tiamina el método que se basa en el crecimiento del *Phycococcus blakesleanus*, en un medio compuesto por asparagina y sales

minerales.

Se basa en pesar el micelio seco para determinar la cantidad de tiamina presente por interpolación en una curva obtenida usando cantidades conocidas de tiamina (34).

Otro método se basa en la fermentación producida por el *Saccharomyces cerevisiae* (35).

También fué utilizado el *Propionibacterium pentosaceum* determinándose la cantidad de tiamina presente por la producción del CO_2 después de un cierto tiempo.

Niven y Smiley recomiendan el uso del *Streptococcus salivarius*. La determinación se hace por la cantidad de cultivo turbidimétricamente (37).

El método de Sarett y Cheldelin (38) parece dar excelentes resultados recomendando el uso del *Lactobacillus fermentum* 36. En este método, al igual que en el anterior, la determinación se hace por la cantidad de cultivo a las 18 horas (turbidimétricamente); más tarde, después de las 48 horas, el crecimiento está influenciado por la presencia de la pirimidina y el tiazol (grupos que forman la tiamina).

El medio de Sarett y Cheldelin está compuesto por las siguientes substancias en concentraciones adecuadas para el perfecto crecimiento de las bacterias.

Peptona, tratada con HONa .

Caseína libre de vitaminas e hidrolizada.

Cistina

Glucosa

Acetato de Na.

Adenina, guanina y uracilo

Riboflavina, d-pantotenato de Ca, ácido nicotínico, piridoxina, biotina, ácido fólico y p-amino benzoico.

ClNa , PO_4HK_2 , $\text{PO}_2\text{H}_2\text{K}$, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, y Cl_3Fe (anhidro.)

La preparación de los líquidos en los que se quiere determinar la tiamina, debe hacerse de una manera especial que consiste en incubarlos a 31° C por 24 horas con taka-diastasa bajo tolueno.

(¹) Ensayo microbiológico para la determinación del ácido pantoténico.

En un principio se hicieron las determinaciones cuantitativas del ácido pantoténico mediante el uso de levaduras (39). Este método fué pronto reemplazado por el empleo de bacterias lácticas que dieron mejores resultados.

También fué utilizado el *Proteus morganii*, haciéndose las determinaciones turbidimétricamente (40).

Entre las bacterias lácticas recomendadas se encuentran el *Lactobacillus arabinosus*, y el *Lactobacillus helveticus*, siendo los mejores resultados los obtenidos por el uso del primero.

La determinación cuantitativa se hace por titulación de la acidez del medio después de 72 horas de incubación, con HONa 0,1 N en presencia de azul de bromo-timol.

(¹) Nota: El método microbiológico para determinar la riboflavina será descrito más adelante cuando nos ocupemos de esta vitamina en particular.

El medio de HOag, Sarett y Cheldelin (41) lleva las siguientes substancias en las proporciones adecuadas:

Peptona tratada con HONa.

Caseína hidrolizada en medio ácido y libre de vitaminas

Cistina

Glucosa

Acetato de Na

Xilosa

Adenina, guanina, uracilo y xantina.

Tiamina, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxina, biotina, ácido p-amino benzoico.

Sales minerales las mismas que se utilizan para el ensayo de la tiamina, más $SO_4 (NH_4)_2$.

El ácido pantoténico es muy inestable ya sea en medio ácido o en medio básico; por ello los extractos en los cuales se lo quiere determinar previamente se los trata con taka-díastasa y en el digerido se efectúan las determinaciones.

En lo demás se asemeja al método de la riboflavina que más adelante se explicará con todo detalle.

Ensayo microbiológico para la determinación del ácido nicotínico:

El método microbiológico para la determinación cuantitativa del ácido nicotínico propuesto por Snell y Wright (42) y modificado por Barten y Wright tiene muchas ventajas sobre los presentados por otros autores.

Tiene una sensibilidad mucho mayor que la de los métodos químicos. Se utiliza para la determinación el *Lactobacillus arabinosus* 17-5. Se hacen titulaciones de la acidez producida después de 72 horas de incubación e interpolando en curvas tipos se deduce la concentración de la vitamina. También pueden hacerse determinaciones turbidimétricas.

En la composición del medio se encuentran las siguientes sustancias en concentraciones adecuadas para obtener un perfecto crecimiento:

Caseína hidrolizada en medio ácido y libre de vitaminas.

l-cistina

Glucosa

Acetato de Na

Xilosa

Adenina, guanina, uracilo y xantina

Aneurina, riboflavina, piridoxina, pantotenato de Ca, ácido p-amino benzoico, biotina.

Sales minerales: las mismas que se utilizan para el ensayo de la tiamina más $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Para la determinación cuantitativa del ácido nicotínico en sustancias naturales, se preparan extractos de las mismas por medio de una hidrólisis ácida. Si el contenido de grasa en las mismas es elevado, se recomienda extraerlas con tratamiento con éter de petróleo; para prevenir toda formación de emulsiones.

////

Ensayo microbiológico para la determinación de la piridoxina:

Uno de los primeros métodos microbiológicos para la determinación de la piridoxina es el de Eakin, y McMahan (43) que utiliza el crecimiento del *Saccharomyces cerevisiae*; las determinaciones se hacen turbidimétricamente.

Un método que dá excelentes resultados es el de Stokes (44) por el empleo de la *Neurospora sitophila*. Se basa en pesar el micelio seco a los 5 días de incubación en un medio adecuado para su crecimiento. Tiene la ventaja de no ser afectado por soluciones coloreadas o turbias.

Para la determinación de la piridoxina no pueden utilizarse las bacterias lácticas, pues son muy sensibles a la presencia de la piridoxina.

El medio basal tiene los siguientes componentes en las concentraciones adecuadas:

Sucrosa

Tartrato de amonio, citrato mono sódico

PO_4H_2K , $SO_4Mn.7H_2O$, $ClNa$, Cl_2Ca , Cl_3Fe , $SO_4Zn.7H_2O$

Biotina

Para la determinación de la piridoxina en sustancias naturales, se hace una hidrólisis ácida de las mismas, y luego es indispensable la destrucción total de la tiamina, pues ésta interfiere favoreciendo el crecimiento del microorganismo en presencia de piridoxina.

Ensayo microbiológico para la determinación de la biotina:

En un principio se utilizó el método de Lampen, Bahler y Peterson (45) que se basa en la turbidez producida por el *Clostridium butylicum* en condiciones de anaerobiosis en un medio compuesto por: glucosa, asparagina y sales minerales.

También fué ensayado un método con *Saccharomyces cervisiae*, haciéndose las lecturas turbidimétricamente (46).

Barton y Wright (47), determinan cuantitativamente a la biotina por el cultivo del *Lactobacillus arabinosus*. Se ha ensayado el *Lactobacillus helveticus* pero no dá tan buenos resultados como el primero.

El medio está compuesto por las siguientes substancias en las concentraciones adecuadas para obtener un buen crecimiento:

Caseína hidrolizada en medio ácido y libre de vitaminas.

l-Cistina

di-triptófano, ácido nicotínico, riboflavina, tiamina, piridoxina y ácido p-amino benzoico

Adenina, guanina, uracilo y xantina

Sales minerales: las mismas que se utilizan para el ensayo de la tiamina, más $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Debe tenerse especial cuidado de eliminar de la caseína toda traza de biotina, ya que el *Lactobacillus arabinosus* es sumamente sensible a ella. La temperatura a la cual se incuban los tubos no debe ser superior de los 30° C.

Las substancias en las cuales quiere determinarse el contenido de biotina, deben ser sometidas previamente a una hidrólisis

sis con SO_4H_2 . También es necesario eliminar del extracto hidrolizado todo contenido de grasas, para ello debe hacerse una extracción etérea.

Ensayo microbiológico para la determinación del ácido-amino benzoico:

El método de Landy y Dicken's (48) utiliza el *Acetobacter suboxydans* (American Type Culture Collection, N° 621); las mediciones se realizan turbidimétricamente.

El método de Lewis (49) que da mejores resultados que el anterior, utiliza el *Lactobasillus arabinosus*. Se basa en la medida de la acidez producida en el medio después de un período de incubación de 72 horas. Se hace la titulación del ácido láctico producido con HONa 0,1 N, utilizando como indicador azul de bromo-timol.

El medio basal utilizado, está compuesto por las siguientes sustancias en las concentraciones adecuadas:

Caseína hidrolizada en medio ácido y libre de vitaminas

1- Cistina

1-triptófano, riboflavina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, piridoxina y biotina.

Acetato de sodio

Adenina, guanina y uracilo

$\text{PO}_4\text{HK}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ClNa , $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
 $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Substancias que contengan ácido o-o m-amino benzoico tienen muy poca actividad, lo que posiblemente podría atribuirse a impurezas de ácido p-amino benzoico.

La preparación de los extractos se hace por hidrólisis ácida previa.

Ensayo microbiológico para la determinación del inositol:

Para la determinación cuantitativa del inositol puede utilizarse el método de Williams, Stout, Mitchell, y Mc Mahen (50) que recomiendan el empleo del *Saccharomyces cerevisiae* en un medio basal adecuado para un buen crecimiento. La determinación se hace turbidimétricamente.

Ensayo microbiológico para la determinación del ácido fólico:

El ácido fólico puede determinarse turbidimétricamente por el crecimiento del *Lactobacillus casei* utilizando un medio compuesto por las siguientes sustancias en las concentraciones adecuadas: (51)

Caseína hidrolizada en medio ácido y libre de vitaminas

Glucosa

Triptófano, tiamina, piridexina, riboflavina, ácido nicotínico y biotina, ácido pantoténico.

Sulfate de adenina

Cistina

Guanina, xantina, uracilo

Sales minerales: las mismas que se utilizan para el ensayo de la tiamina.

GENERALIDADES SOBRE LA RIBOFLAVINA

La riboflavina participa activamente en el metabolismo de ciertas bacterias lácticas y propiónicas, así también como en el del *Streptococcus hemolyticus* y ciertas bacterias luminiscentes.

Orla Jensen fué quien por primera vez encontró que la riboflavina era un nutriente muy importante para las bacterias lácticas.

Investigaciones sistemáticas han permitido establecer métodos microbiológicos para la determinación de éste factor, utilizando precisamente dichas bacterias lácticas.

En el siguiente cuadro (52) puede verse la influencia de la riboflavina en el crecimiento de ciertas bacterias:

<u>Organismo</u>	<u>Acción de la riboflavina en ciertas bacterias</u>
<i>Streptococcus hemolyticus</i> del grupo A de Lensenfield	Nutriente esencial (53),(54)
<i>Streptococcus faecalis</i>	Nutriente esencial (55)
Bacterias lácticas (<i>Lactobacillus</i>)	Para algunas la riboflavina es un nutriente esencial, para otras un estimulante del crecimiento y en otras no influye su falta o presencia (56),(57),(58),(59).
Bacterias propiónicas	Como estimulante del crecimiento, Las cepas pueden adquirir la propiedad de sintetizarla (60).
Algunas bacterias luminiscentes	La riboflavina es nutriente esencial para su crecimiento y la luminiscencia. Algunas variantes pierden la propiedad de sintetizarla.(61)

Snell y Strong (63), (57), estudiaron los efectos producidos por la riboflavina en once bacterias lácticas. Llegaron a la siguiente conclusión: el *Lactobacillus arabinosus*, *Lactobacillus pentesus*, *Lactobacillus brassicae*, *Lactobacillus pentoaceticus*, *Lactobacillus mannitopocus*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus lactis* crecen abundantemente tanto en ausencia como en presencia de la riboflavina.

Pero 4 especies, a saber: *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus gangori*, *B. lactis acidii* y *Lactobacillus casei* tedes necesitaban de la riboflavina no produciéndose crecimiento en sucesivos sub-cultivos.

Es comprensible que estos hallazgos condujeran inmediatamente a usar dichas bacterias para la investigación del metabolismo de la riboflavina, así como para la estimación cuantitativa.

Es así como en el año 1937, (64) Snell, Tatum y Petersen resuelven utilizar dichas bacterias para la determinación cuantitativa de la riboflavina.

Para que los resultados cualitativos encontrados por los autores mencionados pudieran alcanzar la exactitud requerida para estudio metabólicos cuantitativos era necesario disponer de un sistema apropiado y fácil de reproducir exactamente.

Fué imprescindible encontrar un medio de cultivo apropiado, siendo así como se propuso el siguiente:

MEDIO 1

Peptona Bacto	0,5 %
Glucosa	1,0 %
Sales minerales	(K, Na, Mn, Fe, Cl, PO ₄)

Las mezclas minerales que intervienen en la composición del medio anterior tienen la misma composición y concentración que las recomendadas por Speakman (1923) (65). Pudiendo deberse el éxito de las mismas a la presencia del Mn que favorece mucho el crecimiento del *Lactobacillus casei*.

Al sembrarse en el medio 1 *Lactobacillus delbrückii* en lugar del *Lactobacillus casei*, el crecimiento obtenido resultaba muy escase , y aún con el agregado de CO₃Ca como buffer, no se conseguía ninguna mejora del medio, en cambio con el agregado de caldo de carne se conseguía un crecimiento óptimo.

Prosiguiendo los estudios se vió que en los medios con acetato las bacterias crecían muy bien, produciendo mucho ácido. En un principio se creyó que el acetato actuaba solo como buffer, no resultando así, pues al reemplazarlo por otras sustancias buffer el crecimiento fué deficiente.

El tratamiento de la peptona con HONa destruye toda la riboflavina presente en ella haciéndose necesario el agregado de dicha vitamina al medio para un buen crecimiento. En un medio adecuado para el crecimiento del *Lactobacillus casei*, el crecimiento bacteriano es directamente proporcional a la concentración de riboflavina presente.

El medio 1 preparado con peptona, tratada con álcali,

y una cierta cantidad de riboflavina, resulta bueno como medio de cultivo siempre que se agregue acetato de Na o caldo de carne.

Snell, Strong y Peterson llegan después de muchos estudios a aconsejar el uso del siguiente medio.

MEDIO 2

	sol. para 100 ml.
Sol. de peptona tratada con HONa	0,5 gr.
Glucosa	1,0 gr.
Acetato de Na	0,01 gr.
Cistina	0,01 gr.
Riboflavina	0,01 gr.
Sales minerales	

La cistina no debe considerarse esencial para el crecimiento, solo lo favorece.

Snell, Strong y Peterson comprobaron que en caldo de carne había una substancia activa para el crecimiento de los microorganismos, resultando ser ésta el ácido pantoténico. Con el solo agregado de 0,05 microgramos por ml. daba resultados satisfactorios para el crecimiento del *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus casei*, y *Lactobacillus arabinosus*, siempre que estuviese en presencia de la riboflavina.

Snell, Strong y Peterson, resuelven reemplazar la peptona tratada con HONa, por caseína hidrelizada en medio ácido, lo que dió buenos resultados salvo el agregado posterior del triptófano, amino ácido necesario, que se destruye con el calentamiento ácido.

A continuación se dá la composición de otro medio de

cultivo adecuado para la determinación cuantitativa de la riboflavina.

MEDIO 3

Caseína libre de vitamina (hidrólisis ácida)	0,6 %
Glucosa	1,0 %
Acetato de sodio	0,6 %
Cistina	0,01 %
Triptófano	0,01 %
Riboflavina	0,1 ppm.
Acido pantoténico (concentrado de)	0,5 ppm.
Sales minerales	

Cuando el medio 3 se sembraba con bacterias lavadas con solución fisiológica (*Lactobacillus*) daba escaso crecimiento, disminuyendo marcadamente después de varios pasajes sucesivos por el mismo medio basal. Con el agregado de ácido nicotínico en la proporción de 0,2 ppm. el crecimiento se mantenía constante a través de los distintos pasajes.

Snell y Ranneferd (66) recomiendan el siguiente medio semi-sintético, para las bacterias lácticas.

MEDIO 4

	Cantidad 1 litro
Caseína tratada con carbón (hidrólisis ácida)	5,0 gr.
Acetato de sodio	6,0 gr.
Glucosa	10,0 gr.
Cistina	0,1 gr.

Triptófano	0,05 gr.
Asparagina	0,1 gr.
Glutamina	0,1 gr.
Riboflavina	200,0 micro gr.
Pantotenato de calcio	200,0 micro gr.
Acido nicotínico	500,0 micro gr.
Clorhidrate de tiamina	200,0 micro gr.
Acido p-amino benzoico	200,0 micro gr.
Biotina	1,0 micro gr.
Acido fólico	5,0 micro gr.
Clorhidrate de pirezina	1000,0 micro gr.
Sulfato de adenina	10,0 micro gr.
Clorhidrate de guanina	10,0 micro gr.
Xantina	10,0 micro gr.
Uracilo	10,0 micro gr.
Salas minerales:	

PO_4HK_2 , PO_4H_2K , $SO_4Mg.7H_2O$, $ClNa$, $SO_4Fe.7H_2O$, y $SO_4Mn.4H_2O$

Woolley (67) ensayó el efecto de varias sales en un medio sembrado por *Lactobacillus casei*, llegando a la conclusión siguiente: las sales de Cu, Pb, As, Sb, Sn, Hg, Bi, Cd, Tl, Fe, Zn, y W en la proporción de 0,01 a 100 , no producen ningún efecto inhibitorio cuando están presentes en el medio; el Mn en cambio tiene mucha influencia en el crecimiento favoreciéndolo.

Con el agregado de Mn el crecimiento y la producción de ácido es completa entre las 12 y 16 hs. Sin Mn el mismo creci-

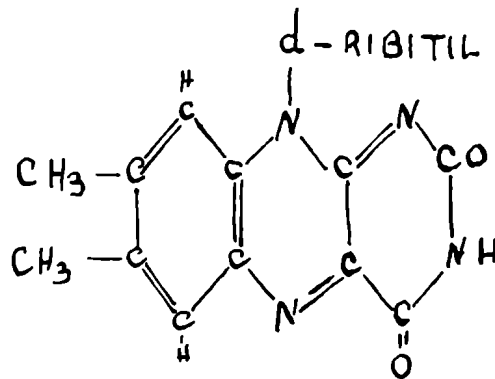
miento y la misma producción de ácido se produce a las 40 hs.

ESPECIFICIDAD DE LA RIBOFLAVINA

La especificidad de la riboflavina y de otras flavinas sintéticas frente al crecimiento de las bacterias fué estudiado por Snell y Strong (68). Utilizaron el *Lactobacillus casei* y el *B. lactis acidii*, para llevar a cabo la experiencia, ya que la riboflavina resulta un nutriente esencial tanto para una como para la otra.

A continuación se enumerará alguna de las flavinas utilizadas:

- 1) 6,7-Dimetil-9-(d-l'-ribitol)-iscoaloxazina (riboflavina)
- 2) 6-etil-7-metil-9-(d-l'-ribilitil)-iscoaloxazina
- 3) 6-metil-9-(d-l'-ribitol)-iscoaloxazina
- 4) 7-metil-9-(d-l'-ribitol)-iscoaloxazina



RIBOFLAVINA

El segundo compuesto de la lista anterior, en donde el radical $-C_2H_5$ reemplaza al radical $-CH_3$ en el C 6 es el único compuesto cuya actividad se aproxima a la de la riboflavina.

El compuesto 7-metil y 6-metil, cuarto y tercero de la lista anterior, tienen actividad decreciente en ese orden.

Los compuestos en los cuales se reemplazó el grupo ribitol por sorbitol o arabitil resultaron completamente inactivos, lo mismo resultó con el 6,7,9-trimetil-iscalloxazina (lumiflavina) y con el 6,7-dimetil-alloxazina, en los cuales se elimina el grupo ribitol, y con el tetra-acetato de riboflavina.

Existen ciertas sustancias análogas a la riboflavina que cuando están presentes en el medio sin la riboflavina, son completamente inactivas. Esas mismas sustancias cuando están presentes en un medio que tiene cantidades de riboflavina menores que el límite necesario para obtener crecimiento suman sus efectos a los de la riboflavina, obteniéndose buen desarrollo.

A continuación se da el nombre de dichas sustancias:

- 5) 6,7-dimetil-9-(d-l'-arabitil)-iscalloxazina
- 6) 6,7-dimetil-9-(l-l'-arabitil)-iscalloxazina
- 7) 6-etil-7-metil-9-(l-l'-arabitil)-iscalloxazina
- 8) 5,6-benze-9-(d-l'-ribitol)-iscalloxazina

Snell y Strong compararon además la actividad de las sustancias análogas a la riboflavina con respecto a la riboflavina, en las ratas.

Las sustancias que resultaban inactivas para las bacterias lo eran también para las ratas, con excepción del tetra-acetato de riboflavina que puede ser utilizado por las ratas. De donde

se deduce que el *Lactobacillus casei* y el *B. lactis acidii* son incapaces de hidrolizar los ésteres mientras que las ratas sí lo son.

CAPITULO IV

METODOS DE DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA RIBOFLAVINA

INSTRUMENTAL REQUERIDO

El instrumental requerido para llevar a cabo esas experiencias es muy sencillo y fácil de encontrar en cualquier laboratorio microbiológico.

A continuación se da una idea del mismo:

Tubos de ensayo:

Los cultivos se hacen en tubos de ensayo de tamaño común. Estos pueden taparse directamente con algodón o de lo contrario con tubos de vidrio invertidos de diámetro mayor que el del tubo de ensayo.

Estufa:

La estufa donde se incuba, el *Lactobacillus casei*, en su medio de cultivo, no debe dar una variación de temperatura mayor de $\pm 0,5^{\circ}$. Puede utilizarse una estufa común, de aire caliente o de lo contrario un baño con termo-regulador.

Pipetas:

Las mediciones en la preparación del medio deben hacerse con exactitud mayor que la empleada en la preparación de la generalidad de los medios microbiológicos, ya que se trata de determina-

ciones cuantitativas. Por ello las pipetas a utilizar deben estar bien calibradas. Se necesitan algunas calibradas al décimo y otras de 1 ml. al centésimo.

Potenciómetro con electrodo de vidrio:

No es indispensable; se utiliza para conocer la cantidad de HONa necesario para neutralizar el ácido láctico producido en la fermentación.

Nefelómetro fotoeléctrico:

No es indispensable; se puede utilizar para mediciones de la turbidez de los cultivos después de un cierto tiempo y en base a ella construir una curva standard con las correspondientes cantidades de riboflavina.

Comparador de Hsaincoole:

Es el más utilizado ya que generalmente se hacen las determinaciones por simple titulación del ácido láctico con HONa en presencia de azul de bromo timol.

En la preparación de los extractos a analizar y del medio basal se utilizan matraces aforados, buretas, etc. material común en cualquier laboratorio químico.

PROPIEDADES DE LAS BACTERIAS LACTICAS

Fuentes de carbono:

Las bacterias lácticas, al igual que otros organismos utilizan, una parte del carbono del medio de cultivo para formar las células, además de varias otras sustancias, aunque la mayor cantidad del mismo sirve como fuente de energía, al transformarse en ácido láctico.

Los ácidos orgánicos son fuente de energía muy débil para las bacterias lácticas ocurriendo lo contrario con los carbohidratos y los alcoholes superiores (69).

Fuentes de nitrógeno:

Las bacterias lácticas no pueden utilizar sales de amonio o un amino ácido como fuente de nitrógeno. Necesitan compuestos nitrogenados complejos, al igual que los animales; así por ejemplo: proteínas o todo el complejo de amino ácidos que las componen.

Como las bacterias lácticas no tienen en general ninguna enzima proteolítica, la fuente nitrogenada debe ser dada en forma soluble o en estado coloidal.

Sales minerales:

Las sales minerales requeridas por las bacterias lácticas se diferencian de las que necesitan otros microorganismos en el alto contenido en manganeso que requieren para su crecimiento óptimo. En un principio se creyó que necesitaban una gran cantidad de hierro,

pero estudios posteriores no lo confirman. En realidad no es mucho lo que se sabe acerca del metabolismo mineral y es muy posible que más tarde modifiquen las mezclas minerales utilizadas.

Los organismos lácticos se han dividido en dos grupos según la acción sobre la glucosa: homofermentativos y heterofermentativos.

Los homofermentativos oxidan casi cuantitativamente glucosa a ácido láctico (una molécula de glucosa da dos de ácido láctico). Los organismos que pertenecen a ese grupo son: *Lactobacillus helveticus* (casei e), *Lactobacillus arabinosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus delbrückii* y *Streptococcus faecalis*.

En el grupo heterofermentativo se encuentran organismos como el *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus fermentum* que forman a más del ácido láctico, etanol y CO_2 .

El pH óptimo para el crecimiento de la mayoría de estas bacterias lácticas está entre 6 y 7, en la práctica se usa pH 6,8 pero el crecimiento sigue hasta que se alcance un pH de 4 o menos.

Para formarse ácido láctico, es necesario agregar un buffer para impedir variaciones de pH que puedan interferir seriamente o llegar hasta inhibir el crecimiento. Snell, Strong y Peterson (64) encontraron que el acetato de Na es muy conveniente para ese propósito.

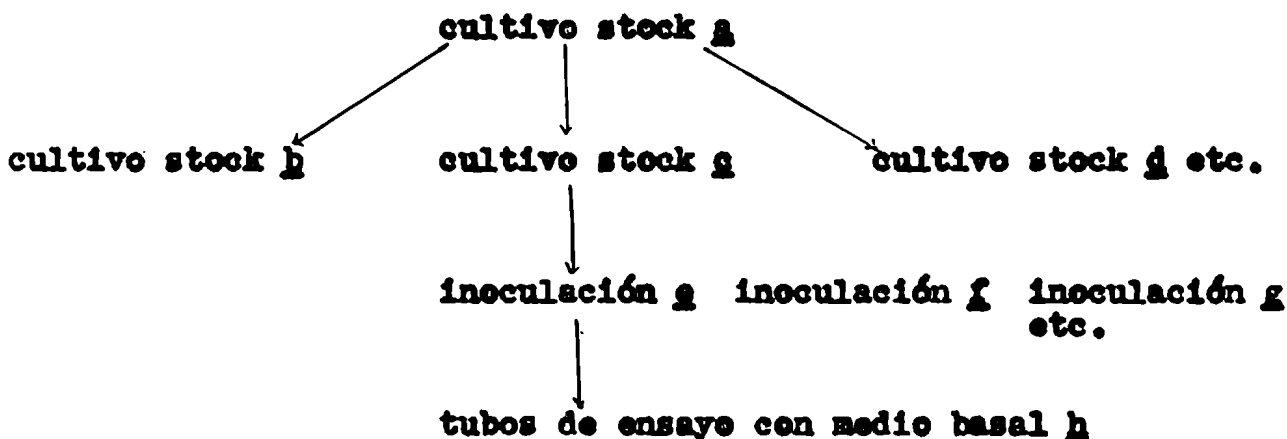
La bacteria utilizada para la determinación cuantitativa de la riboflavina pertenece a la especie: *Lactobacillus*, que se caracteriza por producir solo trazas de otros productos que no sean ácido láctico pudiendo ser éste inactivo o d-. Se la conoce con el nombre de *Lactobacillus helveticus* o *Lactobacillus casei* e (Amer. Type Culture Collection, Nº 7469).

Se presentan en forma de bastones, pudiendo tener un tamaño que varía entre 0,7-0,9 por 2,0 a 6,0 micrones pudiendo estar aislados e en cadenas. Son bastones inmóviles y Gram positivos.

Las colonias en agar lactosa se caracterizan por ser chicas, pues no crecen muy bien en un medio con agar. Acidifican y coagulan la leche. Forman ácido a partir de la dextrosa, levulosa, galactosa, manosa, maltosa, lactosa y pequeñas cantidades a partir de la dextrina.

Han sido aisladas a partir de la leche y del queso.

La cepa del *Lactobacillus casei* e que se utiliza en la determinación cuantitativa de la riboflavina debe mantenerse en la heladera y en las siguientes condiciones: (58) Se hacen estrías en un medio de agar-agua de levadura con un contenido de glucosa al 1%. Se toma un tubo como cultivo stock, y a partir de él se hacen cultivos sucesivos como se explica a continuación:



Del cultivo original g se hacen una serie de estrías: h, g y d en agar levadura glucosa. Después de 24 horas, o menos, de incubación a cualquier temperatura entre 30 y 37° C, a condición de que una vez fijada ésta no sea la variación de $\pm 0,5^{\circ}$ C se guardan

en la heladera.

Por lo menos un tubo, h , se guarda como cultivo stock. Los otros tubos (g, d) se usan para la siembra en los tubos que contienen el medio basal.

Si los ensayos se hacen cada día no se necesita inocular a partir de un tubo stock (g, d) puede pasarse directamente una gota del tubo g a un tubo similar f que debe ser incubado para usar al día siguiente.

Los cultivos que se empleen en la siembra de los tubos con el medio basal no deben tener más de 36 horas.

Para evitar todo cambio por variación bacteriana, es recomendable volver cada 5 días a un cultivo stock. Nuevos cultivos stock correspondientes a h, g y d se preparan con intervalos de un mes tal como el tubo h de un mes anterior.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

A continuación se indicará la preparación de cada uno de los componentes que constituyen el medio basal según los métodos ensayados de los distintos autores.

Peptona hidrolizada, tratada con HONa:

A 40 gr. de peptona Difcebacto se le agregan 250 cc. de agua y una solución de 20 gr. de HONa en 250 cc. de agua. La mezcla de estas dos soluciones se coloca en un cristizador de 25 cm. bajo una luz de 100 wattios con reflexión a una distancia de 30 cm. durante 6 a 10 horas. Pasado este tiempo se deja a la temperatura de la pieza durante 14 a 18 horas.

El HONa se neutraliza con ácido acético glacial (27 cc.) Se agrega luego 7 gr. de acetato de Na anhidro y se lleva a 800 cc.

Esta solución contiene el equivalente de 5% de peptona y 6% de acetato de Na, siendo su concentración 10 veces mayor que la requerida por el medio final (58).

Se guarda bajo tolueno y en la heladera. El tratamiento anterior tiene por objeto destruir toda la riboflavina que pueda contener la peptona.

Barton y Wright (47) aconsejan no utilizar esta solución stock de peptona después de dos semanas, igualmente en caso de que pareciese cualquier precipitado antes de ese tiempo.

Solución de levadura libre de riboflavina:

A una solución de 100 gr. de extracto de levadura Bacto en 500 cc de agua se agregan 150 gr. de acetato de plomo disueltos a su vez en 500 cc de agua. El precipitado formado se filtra.

Al filtrado se le agrega HONH_4 hasta llegar al pH 10.0. Se filtra y el filtrado nuevo se lo acidifica con ácido acético glacial. Es necesario asegurarse de que la extracción del plomo sea total, para ello se agrega NH_2 , se filtra nuevamente y se descarta el precipitado.

Con el tratamiento anterior se saca toda la riboflavina que contiene el extracto de levadura (58).

La solución libre de riboflavina se lleva a un volumen final de 1000 cc. y se guarda bajo tolueno en la heladera. 1 cc. de este preparación equivale a 100 mgr. del extracto de levadura original.

El extracto de levadura consiste en la materia seca de una solución de levadura autolizada y clarificada.

Preparación del extracto de levadura fotolizada:

A una solución de 6 gr. de extracto de levadura Difco en 150 cc de agua destilada se lleva a pH 10.5 con HONa . Esta solución se coloca en un cristallizador tapado con una hoja de vidrio y se fotoliza con una lámpara de 500 watts, durante 10 a 15 horas.

El foco debe estar a una distancia de 20,0 cm. de la superficie de la solución. En caso de aumentar la temperatura del líquido de los 50° C. debe enfriarse.

Para la fotólisis puede emplearse la lámpara de arco

de 3.000 watts que destruye a la riboflavina en un término de 1 a 2 horas.

La solución alcalina es neutralizada con HCl. Se guarda bajo tolueno en heladera. Un cc. de esta solución contiene un equivalente de 40 mgr. de extracto de levadura libre de riboflavina.

Solución Stock de cistina: (Barton-Wright).

Se hierven 4 gr. de cistina en aproximadamente 100 cc. de agua y se agregan 5 cc. de HCl concentrado y se continúa la ebullición hasta que toda la cistina se solubilice.

Se lleva a un volumen de 1.000 ml. con agua y se guarda bajo tolueno en la heladera.

Esta solución contiene un equivalente de 4 mgr./ml de cistina. Con la concentración de HCl agregada no hay peligro que se produzca precipitación y puede durar en la heladera indefinidamente (47).

Solución stock de cistina (Snell-Strong): concentración menor a la anterior: 1 mgr. de cistina por cc. de agua.

dl-triptófano: Es recomendable utilizar dl-triptófano sintético, pues existe el peligro que el l-triptófano esté contaminado con ácido nicotínico,

Para preparar una solución stock se agregan 4 gr. de dl-triptófano en 100 ml. de agua, se hierve y agrega HCl gota a gota hasta la disolución total. La solución se lleva a un volumen final de 1.000 ml. con agua y se guarda bajo tolueno en la heladera. Esta solución puede durar indefinidamente. El equivalente de esta solu-

ción es de 2 mgr/ml, ya que el d-triptófano es inactivo (47).

Solución de adenina, guanina y uracilo:

La solución stock de estas tres sustancias contiene 1 mgr/ml de cada una. La solución se efectúa por un calentamiento prolongado con unas pocas gotas de HCl concentrado. La solución se guarda en heladera bajo tolueno y debe renovarse cada 15 días.

Solución de xantina:

La solución stock contiene 1 mgr/ml. Para que se lleve a cabo la solución deben agregarse unas pocas gotas de HONH_4 . Se guarda bajo tolueno en la heladera y debe renovarse cada 15 días.

Solución de d-pantotenato de calcio:

0,1 gr. de d-pantotenato de calcio se disuelven en 100 ml. de agua. Esta solución contiene 1.000 microgr. de d-pantotenato de Ca por ml. Antes de usar se diluye una parte de la solución en 10 de agua.

La solución stock se guarda en heladera bajo tolueno y se remueva semanalmente.

Solución de piridoxina:

0,244 gr. de clorhidrato de piridoxina se disuelven en 100 ml. de agua. Esta solución contiene 2.000 microgr. de piridoxina por ml. La solución stock se diluye 1 en 20 antes de usar, de modo de quedar una concentración final de 10 microgr. por ml.

La solución se guarda bajo tolueno en la heladera y debe ser renovada semanalmente.

Solución de ácido nicotínico: 0,1 gr. de ácido nicotínico se disuelven en 100 ml. de agua. Esta solución stock es diluida una parte en 10 de agua antes de su uso de modo de tener una concentración final de 100 microgr. por ml.

Se guarda en heladera bajo tolueno y debe renovarse semanalmente.

Solución de riboflavina:

25 mgr. de riboflavina exactamente pesados se disuelven en una pequeña cantidad de agua y ml. de ácido acético glacial. La solución se lleva después a 1 litro con agua. Esta solución contiene 25 microgr. por ml.

Para preparar una solución standard para las determinaciones de la riboflavina se toman 4 ml. de esa solución stock y se diluyen a 1000 ml. de modo de tener una concentración final de 0,1 microgr. de riboflavina por ml.

La solución stock se guarda en la heladera bajo tolueno t debe ser renovada semanalmente.

Solución de ácido p-amino benzoico:

0,1 gr. de ácido p-amino benzoico se disuelve en 100 ml. de agua conteniendo 1 ml. de ácido acético glacial. Antes de usar

esta solución se diluye 1 en 10 de modo de tener una concentración final de 100 microgramos.

La solución stock se guarda en heladera bajo tolueno y debe renovarse semanalmente.

Solución de biotina:

Una ampolla que contiene 25 microgramos de biotina se lleva a un volumen de 250 ml. con agua. Antes de llevar a volumen se agrega 1 ml. de la solución A de sales minerales.

Esta solución contiene 0.1 microgramo por ml. de biotina.

La solución stock se guarda en heladera bajo tolueno, pudiendo permanecer activa aproximadamente tres meses.

Solución A de sales minerales:

25 gr. de PO_4HK_2 y 25 gr. de PO_4H_2K se disuelven en agua y se llevan a un volumen de 250 ml.

Conviene guardar la solución bajo tolueno en la heladera.

Solución B de sales minerales: (Barten-Wright)

10 gr. de $SO_4Mg, 7H_2O$

0.5 gr. $SO_4Mn, 4H_2O$

0.1 gr. Cl_3Fe (anhidro)

se disuelven en 250 ml. de agua con 5 gotas de HCl concentrado para

evitar toda precipitación.

Guardar la solución en heladera bajo tolueno.

Solución B de sales minerales:

10 gr. SO_4Mg

0.5 gr. $ClNa$

0.5 gr. SO_4Fe

0.5 gr. de SO_4Mn

Preparación del agar agua de levadura glucosado:

100 gr. de levadura se colocan en la estufa a $50^{\circ} C$. para que se produzca la autólisis de la misma, se dejan a esa temperatura durante 48 horas.

Pasado dicho período se diluye al medio y lleva a pH 7 con $HONa$ y se deja en autoclave durante 20 minutos a $120^{\circ} C$. Luego se filtra y diluye de modo de quedar a una dilución final de una parte de levadura en 8 partes de agua.

A la solución anterior se le agrega agar para obtener un medio sólido al 2% más 1% de glucosa. Una vez el medio entubado y esterilizado se estrían los tubos y quedan listos para la siembra del *Lactobacillus casei*.

El extracto de levadura es de composición muy compleja. A los efectos de dar una idea de esa complejidad se transcribe a continuación el análisis de un cierto extracto de levadura del comercio.

	<u>Polya</u>
Sólidos	96,00 %
Nitrógeno total	11,50
Nitrógeno aminado (Van Slyke)	6,50
Amina (% del Nitrógeno total)	57,00
Nitrógeno de peptonas	2,00
Nitrógeno de proteasas	0,50
Nitrógeno de polipéptidos, purinas, pirimidinas y amidas (por diferencia)	2,50
Carbohidratos por diferencia	13,10
Substancias reductoras	rastros
Substancias extraíbles por éter	1,50
Cenizas totales	10,00
Cloruro de Na	0,50

Análisis de las cenizas

K_2O	40,10 %
P_2O_5	25,25
Al_2O_3	14,76
Fe_2O_3	2,69
MgO	1,17
CaO	0,35
SiO	2,98

Composición aproximada en los principales cuerpos:

K_2HPO_4	61.90 %
K_2SO_4	12.37
NaCl	3.74

Amino ácidos calculados en base a 16 % de Nitrógeno:

Arginina	3.5 %
Histidina	1.5
Lisina	6.5
Tirosina	4.0
Triptófano	1.0
Fenilalanina	3.5
Cistina	1.6
Metionina	2.0
Treonina	3.3
Leucina	6.4
Isoleucina	4.7
Valina	4.8

Contenido de vitaminas y otras sustancias

Tiamina	2.0 mg
Riboflavina	4.0
Niacina	20.0
Acido pantoténico	10.0
Piridoxina	1.5

Biotina	0.2 mg.
Acido fólico	0.8
Colina	200.0

COMPOSICION DE LOS DISTINTOS MEDIOS

A continuación expresaré la cantidad de cada uno de los componentes que se usan para 250 cc. de cada medio. Debe tenerse presente que los 250 cc son de medio concentrado y alcanza para un total de 50 tubos.

Si se necesita trabajar con 100 tubos debe prepararse 500 cc del medio basal y así sucesivamente.

Medio de Snell y Strong (58) (para 50 tubos)

- 50 cc de peptona fotolizada tratada con H₂O₂
- 50 cc de solución de cistina en HCl
- 5.0 cc de sol. de levadura libre de riboflavina (1)
- 5.0 gr. de glucosa
- 2.5 cc de sol. A.
- 2.5 cc de sol. B.

(1) La levadura usada en nuestros ensayos fué tratada por fotólisis en medio alcalino, en lugar de utilizar la recomendada por Snell-Strong. La modificación se debe a R. D. Greene y Archie Black.

Medio de R. D. Greene y Archie Black:

Medio anterior más: 2.0 % de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$
2.0 % de acetato de Na

Medio de la farmaceuza norte-americana: (1947)

Se diferencia del de Snell-Strong en el contenido de glucosa, que es de 16.5 gr. en lugar de 5.0 gr. por 250 cc de medio concentrado.

Medio de Barton-Wright:

50 cc de solución fotolizada tratada con HONa
12,5 cc de solución l-cistina
12,5 cc de solución l-triptófano
10.0 gr. de glucosa
0.5 gr. de xylosa
20 ml. de solución de levadura libre de riboflavina (')
5.0 ml. de solución adenina, guanina y uracilo
5.0 ml. de solución de xantina
0.5 ml. de d-pantotenato de Ca
0.5 ml. de ácido nicotínico
0.5 ml. de piridexina
2.0 ml. de solución de ácido p-amino benzoico
2.5 gr. de ClNa

(') Fué reemplazada por 0.4 % gr. de extracto de levadura fotolizada.

1.5 gr. de sulfato de NH_4
2.5 cc. de solución sal A
2.5 cc. de solución sal B
agua a 250 cc

De los 4 medios enumerados el que dió mejores resultados fué el de Barton-Wright pues todos los puntos correspondientes a la "curva Standard" caen en una línea recta; ello se debe probablemente a la mejor composición del medio.

Las curvas obtenidas con los otros medios enumerados anteriormente resultaron muy irregulares. De ahí que se utilizara para la determinación cuantitativa de la riboflavina en distintas substancias el método de Barton-Wright.

PREPARACION DEL EXTRACTO EN ENSAYO

El extracto debe prepararse correctamente para que el ensayo microbiológico resulte satisfactorio.

Debe recordarse (71) que el *Lactobacillus casei* es estimulado por ácidos grasos libres, especialmente: esteárico y oleico y puede ser estimulado e inhibido por otras sustancias dependiendo o- llo de la concentración.

Substancias como la sangre, malta y algunos alimentos cocidos como por ejemplo el pan contienen sustancias estimulantes posiblemente de naturaleza lipéide que deben quitarse antes de comen- zar el ensayo o de lo contrario los resultados resultarían altos.

Toda materia sólida en la cual quiere determinarse la presencia de la riboflavina debe ser finamente dividida antes de e- fectuar la extracción.

Un método aconsejable para la eliminación de las subs- tancias grasas es el siguiente (72):

Una cantidad conveniente de muestra se pesa exactamen- te y se hidroliza con HCl 0,1 N durante 15 minutos a 120° C en auto- clave, se enfría y agrega 2ml. de acetato de Na 2,5 M, se ajusta el pH a 4,6 con solución de HONa usando verde de bromo-cresol o azul de bromo-fenol como indicador externo, la solución se lleva luego a ve- lumen. Se filtra, se toma una parte alícuota y el pH se lleva a 6,8 con solución de HONa. Cualquier precipitado que aparezca en este mo- mento debe filtrarse. El volumen de la solución final debe ajustarse de modo de tener lo más cerca posible un contenido de 0,05 microgr. de riboflavina por cc.

Substancias con un contenido alto en grasas, por ejemplo: germen de trigo, carne, etc. deben sufrir una extracción etérea con éter Analar (P. E. 40-60° C) para sacar los ácidos grasos libres. Es mejor extraer en un Soxhlet durante 10 horas. Luego se hidroliza con HCl 0.1 N como se indicó anteriormente.

Al extracto frío se le agregan 2 ml. de acetato de Na 2.5 M, se ajusta el pH a 4.5 con solución de HONa en presencia de verde bromo cresol e azul de bromo fenol como indicadores externos. Se filtra y toma una parte alícuota del filtrado la que se agita con éter etílico.

La parte acuosa se separa y lleva a pH 6.8 con solución de HONa y se lleva a volumen. Los extractos acuosos se guardan bajo tolueno en la heladera, pudiendo agregarse directamente al medio basal.

CAPITULO V

PARTE EXPERIMENTAL

Construcción de la "curva standard":

El cálculo final de la cantidad de riboflavina presente en una determinada solución se efectúa en base a titulaciones efectuadas con HONa 0,1 N en presencia de un indicador adecuado, azul de bromo timol.

La acidez producida en el medio se considera directamente proporcional a la concentración de riboflavina presente en el mismo. Por consiguiente al neutralizar con HONa se conoce la cantidad de ácido láctico producido.

Se elige una escala adecuada y se construye una curva, pudiendo en la ordenada los ml. de HONa gastados y en la abscisa las correspondientes cantidades de riboflavina.

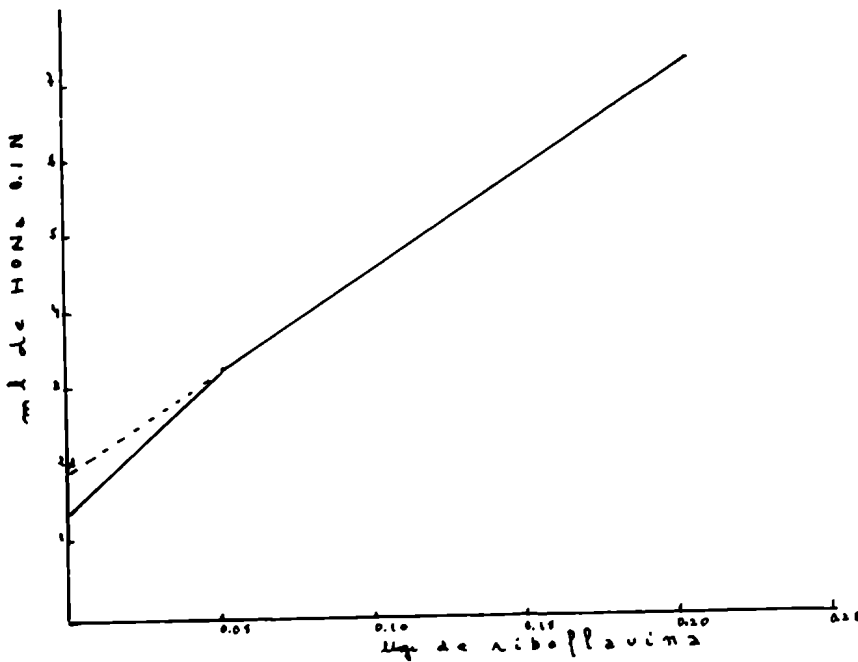
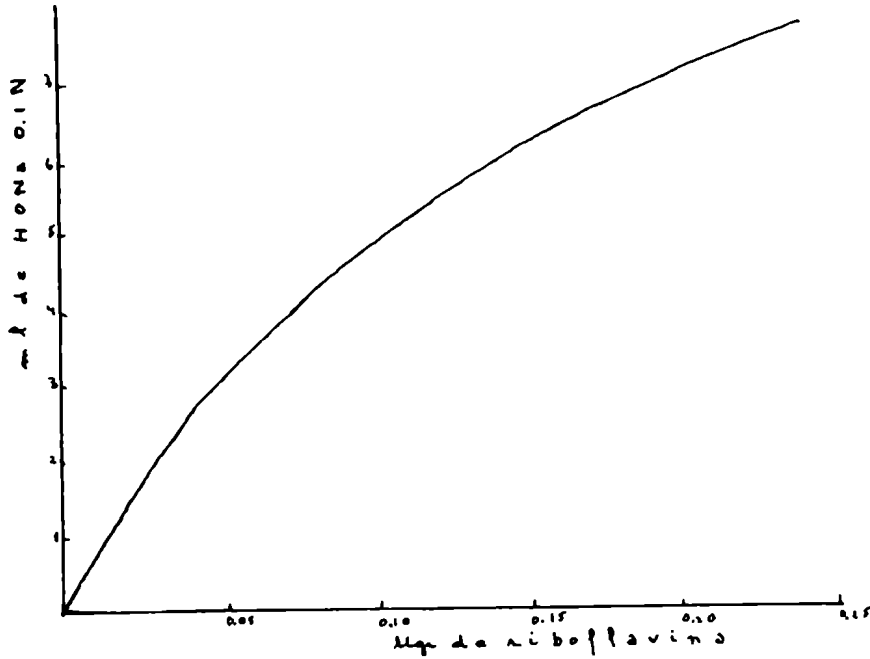
La curva obtenida se denomina "curva standard"; para la construcción de la misma se hacen las siembras en una serie de tubos preferiblemente por cuadruplicados, tomándose el promedio de los ml. de HONa 0,1 N gastados en las cuatro titulaciones.

La curva standard debe repetirse para cada determinación que se efectúe, pues se encuentran así en las mismas condiciones los tubos testigos con los que se construye la curva y los pertenecientes a la muestra en ensayo.

La curva standard puede en general presentar una curvatura que se aproxima a una recta; esto depende mucho del medio basal que se utilice.

Señ recomendables los medios que dan las curvas casi rectas pues como es natural las lecturas están menos sujetas a error.

A continuación pueden verse distintas curvas testigo:



Preparación y siembra de los tubos para la experiencia:

Los distintos métodos de determinación cuantitativa, difieren en los reactivos usados y coinciden prácticamente en el resto de la metodología, preparación de los tubos con medio de cultivo, preparación de la suspensión para la siembra, etc.

Método de Snell-Streng:

En su trabajo original (58), recomiendan el método siguiente: A partir de un tubo stock se hace una siembra del *Lactobacillus casei* en un tubo de centrifuga con 5 ml. del "medio basal" más la suficiente cantidad de riboflavina de modo de tener una concentración de 0.5 a 1.0 microgramos por cada 10 cc de solución final.

El volumen final de los tubos en todos los casos debe ser de 10 ml. en caso de no completarse ese volumen con la solución de riboflavina y el medio basal concentrado, se agregará agua destilada.

El tubo así sembrado se incuba durante no más de 24 horas a una temperatura de 37° C. Pasado ese período se centrifugan las células asépticamente y se resuspenden en igual volumen de solución fisiológica estéril al 0.9 %.

Una gota de la suspensión anterior (0.05 cc) se agrega a cada uno de los tubos que intervienen en la experiencia los cuales se preparan de la siguiente manera.

La curva standard se preparará de preferencia, con los resultados experimentales obtenidos en cuatro tubos para cada dosis de riboflavina.

Las dosis usadas pueden ser las siguientes, que fueron encontradas apropiadas para la experiencia:

Tubo:	1	2	3	4	5	6	7	8
Microgr. de riboflav.	0.0	0.05	0.075	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5

Luego se agregan 5 cc del medio basal y la cantidad correspondiente de agua destilada para completar los 10 ml. Se incuban durante 72 horas a 37° C si se hacen las determinaciones por medio de la acidez sea colorimétricamente o con potenciómetro. Para las determinaciones por la intensidad de cultivo se incuban durante 24 horas; la medida se hace por turbidimetría.

La preparación de los tubos para investigar la presencia o determinar la concentración de la riboflavina se hace del siguiente modo.

A una serie de tubos, de preferencia por cuadruplicado, se agrega la solución a investigar debidamente preparada y con una concentración tal de riboflavina que esté comprendida dentro de la curva. Esto se logrará después de algunos ensayos de aproximación.

Luego se agregan 5 ml. del medio basal concentrado y su suficiente cantidad de agua para completar el volumen de 10 ml.

Por lo menos deben emplearse 3 dosis diferentes del líquido ensayado.

Los tubos de la "curva standard" y los correspondientes al líquido desconocido deben prepararse con el medio basal proveniente de un mismo recipiente, ser inoculados con gotas de la misma sus -

pensión e incubados en la misma estufa o baño; de esa manera se eliminan la mayor parte de las causas de error por influencia de variables incontrolables.

Método de Barton-Wright:

En el método de Barton-Wright (47) que da una curva casi recta se utiliza un número mínimo de tubos para la obtención de la "curva standard".

Tubo	1	2	3	4	5
Microgramo de riboflavina por tubo	0.0	0.05	0.1	0.15	0.2

Se diferencia además por el medio de cultivo y por que la suspensión del *Lactobacillus casei* que se utiliza para la inoculación es más diluida. Esta se hace del siguiente modo: El centrifugado de 10 ml de cultivo se resuspende en 10 ml. de solución salina esteril, 1 ml de esa solución se agrega a otros 10 o 20 ml de solución salina esteril y a partir de esta suspensión se hacen las siembras con una gota.

Determinación de la riboflavina por el ácido láctico formado o por intensidad del crecimiento.

La determinación del ácido láctico producido por el *Lactobacillus casei* después de la incubación, puede determinarse por titulación, usando un indicador o el potenciómetro.

Tanto si se utiliza el indicador o el potenciómetro los



tubos sembrados deben incubarse 72 horas a 37° C, pues es en este tiempo la asociación entre riboflavina y ácidos más completa.

El método potenciométrico tiene el inconveniente de llevar mucho tiempo por la limpieza que exigen los electrodos después de cada determinación y por la agitación del líquido con cada agregado de HONa 0,1 N, lo que exige el uso de equipos especiales. Sin embargo con ello es posible desarrollar una técnica conveniente.

a) por titulación:

El método colorimétrico da excelentes resultados teniendo la ventaja de poder titular en los mismos tubos incubados utilizando como indicador, azul de bromo-timol. Para dar mayor exactitud a las lecturas es conveniente utilizar un comparador, pudiendo ser este el de Walpole.

La titulación se efectúa de la siguiente manera:

Se prepara una solución buffer de pH 6,8 (se mezclan 50 ml. de una solución 0,2 N de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ con el equivalente de 23,65 ml. de una solución 0,2 N de HONa; la mezcla se diluye a 200 ml); 20 ml. de este buffer se vierten en un tubo de ensayo y se agregan 20 gotas del indicador, e 10 ml. con 10 gotas. En otro tubo se pone agua destilada. Se toman 2 tubos del medio incubado con igual concentración del extracto que se investiga; a uno de ellos se le agregan 10 gotas de azul de bromo timol, es decir también a razón de una gota por mililitro, se colocan luego en el comparador de la siguiente manera:

////

A
agua destilada

B
sol. buffer-indicador

C
Medio insubado
más indicador

D
medio insubado

El tubo C se titula con HONa 0,1 N y por cada ml agregado del álcali se le agrega también una gota del indicador. Al tubo D se le agrega la solución del álcali en una cantidad algo menor que al C, lo que tiene por objeto que la dilución efectuada en cada tubo sea aproximadamente igual para que se pueda efectuar con mayor exactitud la comparación.

La neutralización se considera terminada cuando los colores vistos a través de C y D son iguales. Los restantes tubos con teniendo igual volumen y concentración del extracto a investigar se titulan directamente por comparación con C.

b) por crecimiento:

La turbidez es en general máxima a las 24 horas, permaneciendo luego prácticamente constante, por lo tanto la determinación turbidimétrica debe hacerse a las 24 horas.

La determinación del crecimiento puede llevarse a cabo con el nefelómetro fotoeléctrico de Evelyn.

CALCULO DE LA CONCENTRACION DE LA RIBOFLAVINA

El cálculo de la cantidad de riboflavina presente en cada uno de los tubos con los cuales se ha efectuado la determinación puede hacerse directamente por la cantidad de HONa 0.1 N usada en la titulación de cada tubo.

Con esas cantidades y por medio de la "curva standard", se conoce directamente la cantidad de riboflavina presente por tubo.

Debe tenerse en cuenta muy especialmente que la cantidad de riboflavina en los ensayos por triplicado, no difieran entre sí en más de 10 %.

Esta forma de calcular los resultados fué hasta hace poco tiempo, la única conocida, y tiene el inconveniente de que a veces se aceptan como buenos datos que en realidad no lo son.

Al emplear este método, llamado de la "curva simple" se aceptarán como buenos los datos de la substancia a ensayar siempre que los valores en el gráfico estén alineados de manera semejante a la curva standard.

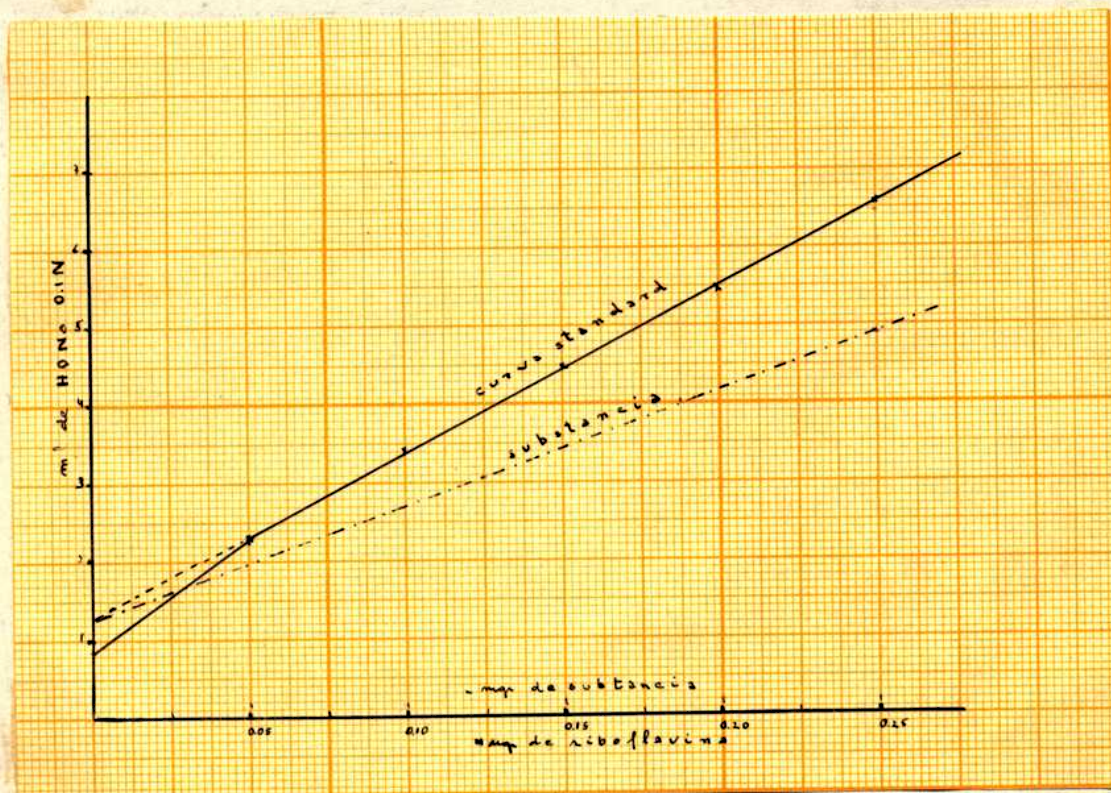
La otra forma de calcular la concentración de la riboflavina es por el método de Wood, (70) (slope-ratio) que dá resultados satisfactorios.

En este caso cuando la curva para la substancia desconocida no corta al eje de las ordenadas en el mismo punto o muy próximo al punto donde lo corta la curva standard, el ensayo no debe considerarse como bueno y es aconsejable repetirlo.

A continuación se dá un ejemplo de como se aplica el método de Wood.

		microgr.de riboflavina (por c/tubo)						mgr. subst.ensayo		
HONa	0,1N	0	0.05	0.1	0.15	0.20	0.25	5	7.5	10
		0.85	2.25	3.4	4.45	5.45	6.4	3.05	4.0	4.9

En este caso el blanco corta a la ordenada en 0,85 en tanto que la prolongación de la recta standard, lo hace en 1,25. La prolongación de la recta correspondiente a la preparación en ensayo corta también a la ordenada en 1,25.



Para el cálculo se considera que la cantidad de ácido producido por la adición de 0,25 microgr. de riboflavina es proporcional a la diferencia entre 6,4 ml - 1,25 ml. = 5,15 ml de HONa 0,1 N.

////

Lo que dá un total de 20,6 ml/microgr.

Con respecto a la preparación en ensayo el incremento de la cantidad de ácido producido por el aumento de riboflavina (entre 5 y 10 mgr. de la preparación) es proporcional a la diferencia entre 4,9 ml - 3,05 ml. = 1,85 ml. de HONa 0.1 N. Correspondiendo a 0,370 ml. de HONa para 1 mgr. del preparado, o sea 370 ml para 1 gr. del preparado.

La relación entre $370 \cdot 20,6 = 17,96$ microgr/gr. da directamente la cantidad de riboflavina presente en cada gr. de la substancia ensayada.

El gráfico correspondiente a este método puede tener dos escalas diferentes en el eje de las X, a saber: microgramos para la construcción de la "curva standard" y mgr. o ml. para la cantidad de la substancia tomada en cada ensayo.

Cuando los resultados obtenidos por los dos métodos no coincidan debe considerarse como más próximo a lo cierto el cálculo obtenido con el método de Weed.

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA RIBOFLAVINA EN DISTINTAS
SUBSTANCIAS**

A continuación se expondrán los distintos ensayos efectuados en distintas sustancias y los resultados obtenidos.

Líquido A: Proveniente de la maceración de 50 gr. de maíz por 8 veces a 50° C y durante 36 horas. El líquido inicial tiene 0,25 % de SO₂ y 0,6 % de ácido láctico.

Composición: Acidez: 0,75 % de HCl

pH : 3,4

SO₂: 0,61 %

Residuo: 6,51 %

10 cc del líquido A se llevaron a 50 cc con agua destilada. De esta solución al 1/5 se agregó 1.0 y 2 cc, a cada tubo, la experiencia se hizo por cuadruplicado.

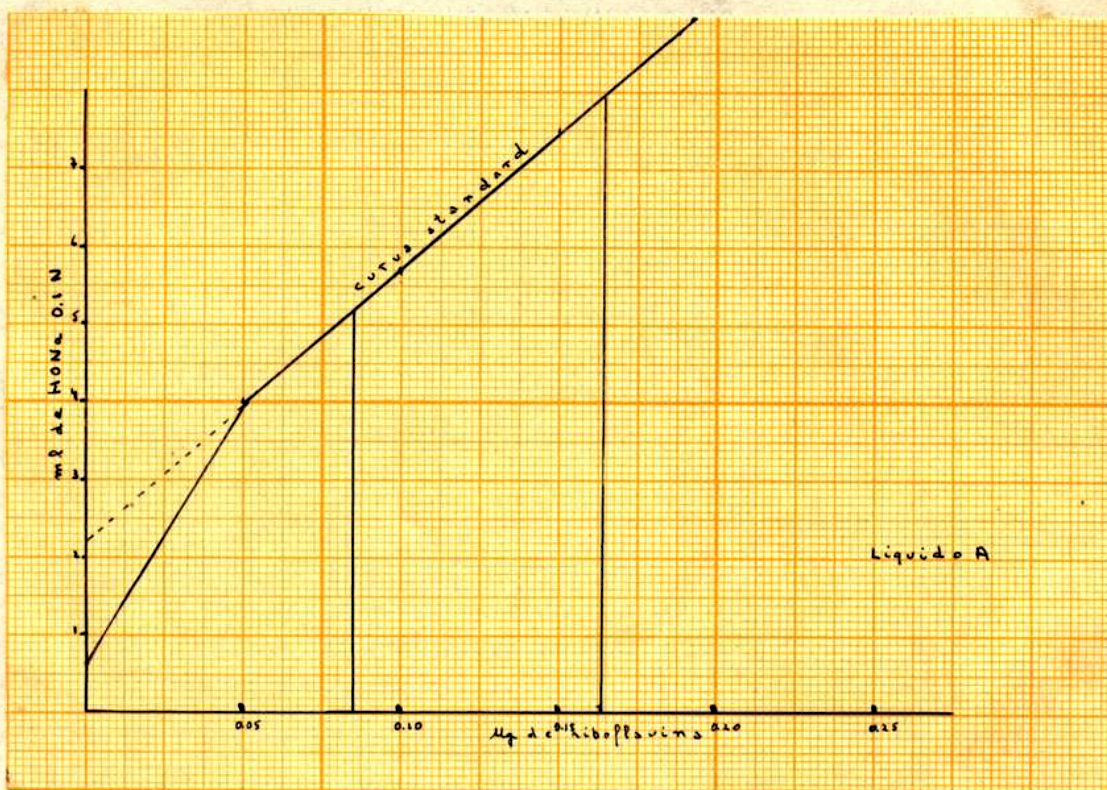
A continuación se dan los valores obtenidos, correspondientes a la curva standard y a la solución en ensayo:

Dosis	Microgr.de riboflavina (curva standard) Sol.liq. A 1/5						
	0	0.05	0.1	0.15	0.20	1.0cm ³	2.0 cm ³
Tube 1	0.65	4.1	5.6	7.5	9.2	5.2	7.9
Tube 2	0.65	3.8	5.6	7.6	9.2	5.1	8.0
Tube 3	0.64	4.1	5.7	7.6	9.25	5.2	8.0
Tube 4	-	-	-	-	-	5.2	8.0
Promedio	0.65	4.0	5.65	7.55	9.25	5.17	7.95

Método de la curva simple:

De acuerdo a la curva standard el líquido ensayado contiene 0.085 microgr. de riboflavina por ml. de la solución al 1/5 y 0,165 microgr. por cada 2 ml. de la solución 1/5.

Promediando los 2 resultados y llevándoles a la dilución original el valor es de 0.420 microgr. por ml. o sea 42.0 microgr. de riboflavina l.



Método de Wood:

Los valores de la curva standard dan 36,25 ml de HONa por microgr. de riboflavina.

A la solución ensayo diluída al 1/5 le corresponden 2,78 ml. de HONa por ml. de solución.

El contenido de riboflavina por ml. de solución 1/5 es de 0,077 microgr. por ml. de solución original es de 0,385 microgr. o sea 38,5 microgr. de riboflavina %.

Líquido B: Líquido proveniente de la maceración de 50 gr. de maíz (8 veces) a 50° C durante 48 horas.

10 cc del líquido B se llevaron a 50 ml. con agua destilada. De esta solución al 1/5 se agregó 1 cc y 2 cc a cada tubo. La experiencia se hizo por cuadruplicado.

////

A continuación se dan los valores obtenidos, correspondientes a la curva standard y a la solución en ensayo:

(1) Microgr.de riboflavina (curva standard) Sol.liq. B 1/5

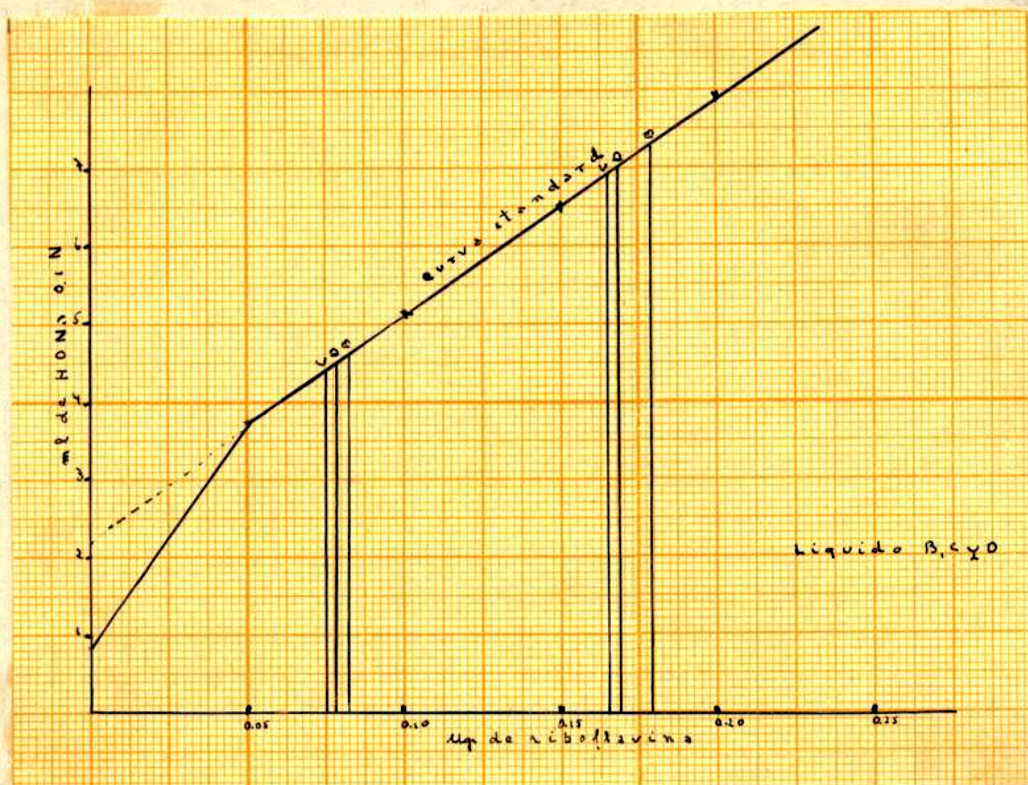
Desis	0.0	0.05	0.1	0.15	0.20	1.0	2.0
Tube 1	0.9	3.7	5.1	6.5	7.80	4.7	7.2
" 2	0.9	3.8	5.1	6.5	7.80	4.4	7.3
" 3	0.8	3.8	5.2	6.5	7.9	4.6	7.4
						4.7	7.3
Promedio	0.85	3.75	5.15	6.5	7.95	4.6	7.3

(1) Los datos de la curva standard para el líquido B sirven también para los líquidos C y D.

Método de la curva simple

De acuerdo a la curva standard el líquido ensayado contiene 0.080 microgr. de riboflavina por ml. de la solución 1/5 y 0.175 microgr. por cada 2 ml. de la solución 1/5.

Promediando los 2 resultados y llevándolos a la dilución original el valor es de 0.415 microgr. por ml. o sea 41.5 microgr. de riboflavina %



Método de Wood

Los valores de la curva standard dan 35.0 ml. de HONa por microgr. de riboflavina.

A la solución ensayo diluida al 1/5 le corresponden 2.7 ml de HONa por ml. de solución.

El contenido de riboflavina por ml. de solución 1/5 es de 0.077 microgr. por ml.; por ml. de solución original es de 0.385 microgr. o sea 38.5 microgr. de riboflavina %.

Líquido C: Líquido proveniente de la maceración de 50 gr. de maíz, a 50° C durante 44 horas. La composición del líquido inicial es: agua-0.125 % SO₂.

Acidos: 0.5 % de HCl
pH : 3,6
SO₂ : 0,015 %
Residue: 3,95 %

10 cc. del líquido C se llevaron a 50 ml. con agua destilada. De ésta solución al 1/5 se agregó 1 cc y 2 cc. a cada tubo. La experiencia se hizo por cuadruplicado.

A continuación se dan los valores obtenidos, correspondientes a la solución en ensayo:

Solución liq. C al 1/5:	1 ml.	2 ml.
Tubo 1	4.5	6.8
Tubo 2	4.5	6.8
Tubo 3	4.3	7.1
Tubo 4	4.4	7.0
Promedio	4.4	6.9

Método de la curva simple

De acuerdo a la curva standard el líquido ensayado contiene 0.075 microgr. de riboflavina por ml. de la solución al 1/5 y 0.162 microgr. por cada 2 ml de la solución 1/5.

Promediando los 2 resultados y llevándoles a la dilución original el valor es de 0.40 microgr. por ml. o sea 40.0 microgr. de riboflavina g.

Método de Wood

Los valores de la curva standard dan 36,0 ml. de HONa por microgr. de riboflavina.

A la solución ensayo diluida al 1/5 le corresponden 2.5 ml de HONa por ml. de solución.

El contenido de riboflavina por ml. de solución 1/5 es de 0.072 microgr.; por ml. de solución original es de 0.360 microgr. o sea 36.0 microgr. de riboflavina g.

Líquido D: Líquido proveniente de la maceración de maíz durante 31 horas a 50° C. La composición del líquido inicial es: agua-0.25 % SO₂.

Composición: 0.55 % de HCl
pH: 3,8
SO₂: 0.025 %
Residuo: 5,55 %

10 cc del líquido D se llevaron a 50 ml. con agua destilada. De esta solución al 1/5 se agregó 1 cc. y 2 cc. a cada tubo. La experiencia se hizo por cuadruplicado.

A continuación se dan los valores obtenidos, correspondientes a la solución en ensayo:

Solución líq. D al 1/5:	1 ml.	2 ml.
Tube 1	4.5	7.2
Tube 2	4.4	6.9
Tube 3	4.5	7.1
Tube 4	4.6	7.0
Promedio:	4.5	7.0

Método de la curva simple

De acuerdo a la curva standard el líquido ensayado con tiene 0.077 microgr. de riboflavina por ml. de la solución 1/5 y 0.167 microgr. de riboflavina por cada 2 ml. de la solución 1/5.

Promediando los 2 resultados y llevándolos a la dilución original el valor es de 0.40 microgr. por ml. o sea 40.0 microgr. de riboflavina g.

Método de Wood:

Los valores de la curva standard dan 35.0 ml de HONa por microgr. de riboflavina.

A la solución ensayo diluida al 1/5 le corresponden 2.5 ml de HONa por ml de solución.

El contenido de riboflavina por ml. de solución 1/5 es de 0.072 microgr.; por ml. de solución original es de 0.360 microgr. o sea 36.0 microgr. de riboflavina g.

////

Líquido 1:

El líquido llamado 1, fué obtenido del siguiente modo y utilizado en su tema de tesis por la Dra. J. Durieux.

1 Kgr. de levadura de cerveza se autoliza a 50° C durante 48 horas. Después de este período queda completamente fluida. Se lleva a pH 7 con HONa, se diluye al medio y filtra. El filtrado constituye el extracto de levadura. Se deseca al vacío y luego se hacen varias extracciones del mismo con alcohol de 95°. El filtrado constituye el extracto soluble en alcohol, el cual se deseca al vacío y luego se diluye en agua.

Este líquido proveniente del soluble en alcohol se llamó líquido 1 y llevado a sequedad dió un residuo seco de 6 %.

A continuación se dan los valores obtenidos correspondientes a la curva standard y al líquido 1.

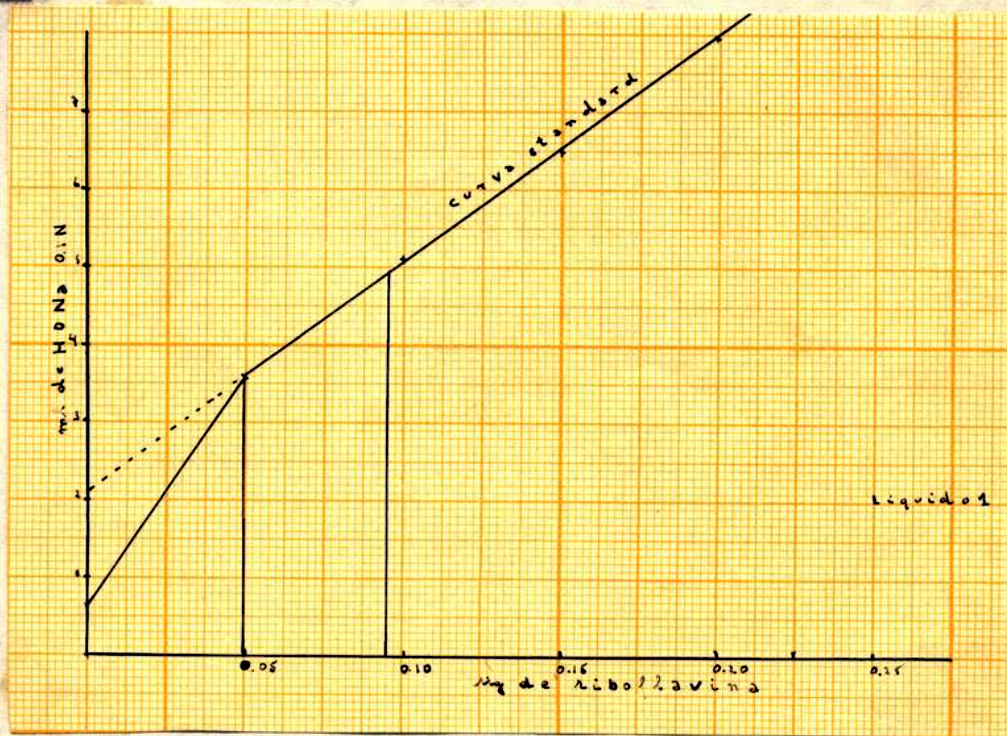
Microgr. de riboflavina (curva standard) Sol. líq. 1 l/50 ml.

Dosis	0.0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.5	1.0
Tubo 1	0.7	3.6	5.1	6.5	8.0	3.5	4.9
Tubo 2	0.6	3.6	5.2	6.6	7.9	3.5	4.8
Tubo 3	0.6	3.5	5.0	6.4	8.0	3.4	4.9
Tubo 4						3.5	4.9
Promedio	0.65	3.6	5.1	6.5	7.95	3.5	4.9

Método de la curva simple

De acuerdo a la curva standard el líquido ensayado contiene 0.095 microgr. de riboflavina por ml. de la solución 1/50 y 0.05 microgr. por 0.5 ml. de la solución al 1/5.

Promediando los 2 resultados y llevándolos a la dilución original el valor es de 4.90 microgr. por ml. o sea 490 microgr. de riboflavina %.



Método de Wood

Los valores de la curva standard dan 29.75 ml. de HONa por microgr. de riboflavina.

A la solución ensayo diluida al 1/50 le corresponden 1.4 ml de HONa por 0.5 ml. de solución.

El contenido de riboflavina por ml. de solución 1/50 es

de 0.004 microgr.; por ml. de solución original es de 4.70 microgr. o sea 470 microgr. de riboflavina %.

Se hizo además la determinación del contenido de riboflavina en tabletas de levadura del comercio que asegura un contenido de 0.03 mgr. de riboflavina por pastilla.

La determinación se ensayó en 2 formas: a) Con el soluble en agua, sin ninguna extracción de materia grasa y b) Con el soluble en agua previa extracción de materia grasa.

Los resultados de ambos trabajos son distintos, pudiéndose ver la acción de las substancias grasas en la producción de ácido láctico, que es mayor en presencia de ellas.

A continuación se exponen los resultados obtenidos a partir de la solución de una pastilla entera, de extracto de levadura en 250 cc. de agua destilada y los datos de la curva standard correspondiente.

Se disolvió una pastilla en 250 cc. de agua destilada. De esta solución se agregó 1 cc. y 1,5 cc. a cada tubo, la experiencia se hizo por cuadruplicado.

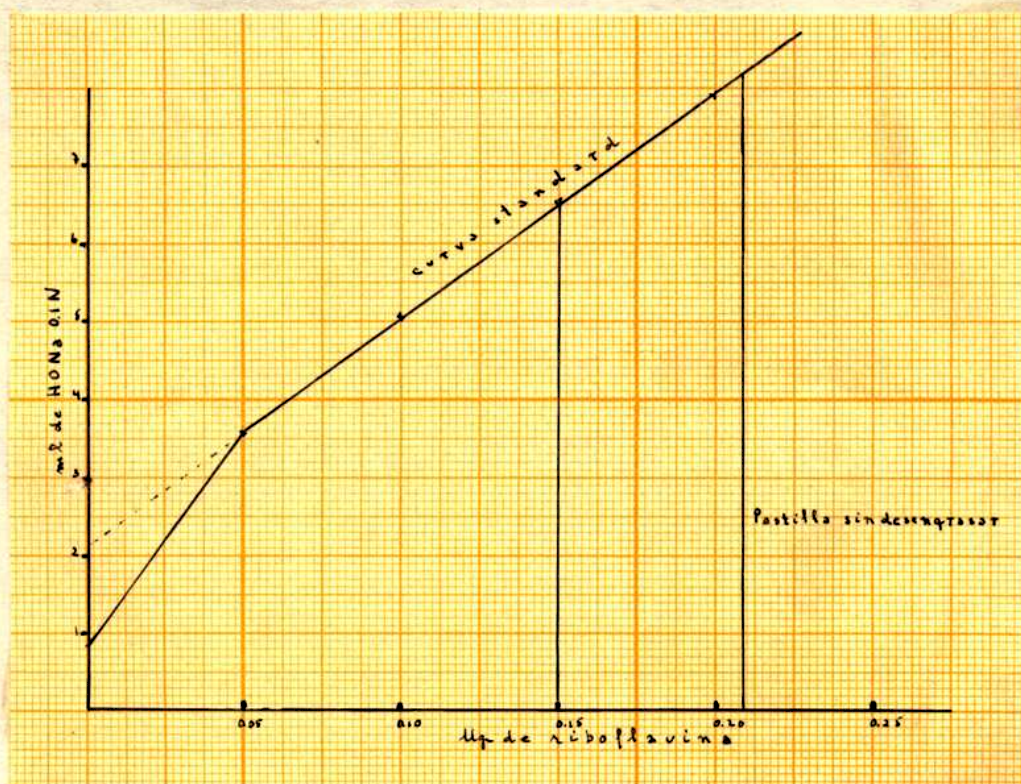
microgr. de riboflavina (curva standard) Sol. 1 en past. en 250 cc

Decis	0.0	0.05	0.10	0.15	0.20	1,0	1.5
Tubo 1	0.9	3.7	5.0	6.5	7.9	6.5	8.2
Tubo 2	0.9	3.7	5.0	6.5	7.8	6.5	8.1
Tubo 3	0.8	3.5	5.1	6.7	7.9	6.4	8.2
Tubo 4						6.5	8.2
Promedio	0.86	3.6	5.05	6.55	7.9	6.5	8.2

Método de la curva simple

De acuerdo a la curva standard el líquido ensayado contiene 0.150 microgr. por ml. de la solución, y 0.21 microgr. por cada 1.5 ml. de la solución.

Promediando los 2 resultados y llevándolos a la dilución original el valor es de 0.036 microgr. de riboflavina por pastilla.



Método de Wood

Los valores de la curva standard dan 28 ml de HONa por microgr. de riboflavina.

A la solución de la pastilla diluída en 250 cc de agua le corresponde 3.4 ml. de HONa por ml. de solución.

El contenido de riboflavina por ml. de solución es de 0.121 microgr. Resultando 0.030 mgr. por pastilla.

b) Con extracción de la materia grasa:

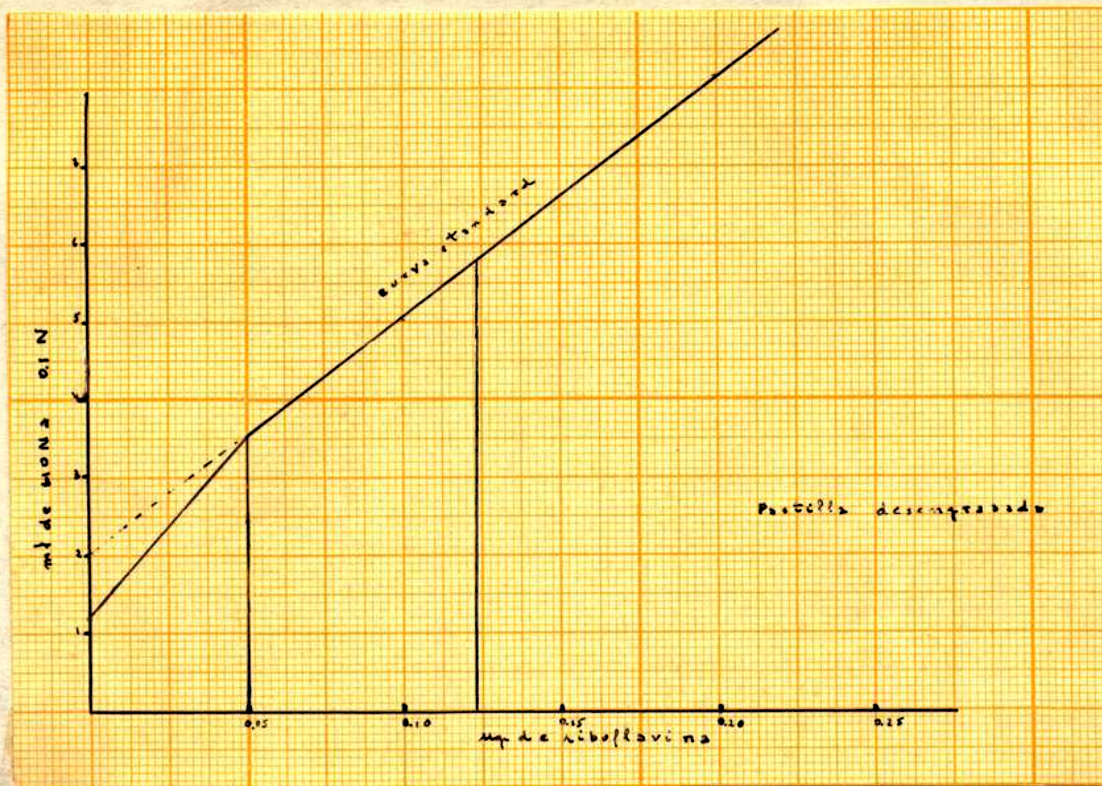
De los 100 cc de una pastilla de levadura, exentos de materia grasa (pág.) se tomaron 10 ml y se llevaron a su vez a 100 cc., quedando una dilución de una pastilla en 1000 cc. De esta solución se agregó 5 cc. y 2 cc. a cada tubo; la experiencia se hizo por cuadruplicado.

	microgr. de riboflavina (curva standard) Sol. 1/1000						
Dosis	0.0	0.05	0.10	0.15	0.20	2.0	5.0
Tubo 1	1.2	3.4	5.0	6.7	8.2	3.5	5.9
Tubo 2	1.2	3.6	5.0	6.6	8.0	3.6	5.8
Tubo 3	1.2	3.5	5.1	6.6	8.3	3.5	5.8
Tubo 4						3.5	5.8
Promedio	1.2	3.5	5.0	6.6	8.15	3.5	5.8

Método de la curva simple

De acuerdo a la curva standard el líquido ensayado contiene 0.05 microgr. por cada 2 ml. de la solución, y 0.122 microgr. por cada 5 ml. de la solución.

Promediando los 2 resultados y llevándolos a la dilución original el valor es de 0.024 mgr. de riboflavina por pastilla.



Método de Wood

Los valores de la curva standard dan 36.25 ml. de HONa por microgr. de riboflavina.

A la solución de las pastilla diluída en 1/1000 cc. le corresponden 0.766 ml. de HONa por ml. de solución.

El contenido de riboflavina por ml. de solución es de 0.024 microgr. Resultando 0.024 mgr. por pastilla.

ENSAYOS CON DISTINTOS MICROORGANISMOS

Con el objeto de reconocer las posibles analogías y diferencias nutritivas de varias bacterias lácticas, se hicieron ensayos de cultivarlas en el medio básico utilizado (Barton-Wright); al cual fueron agregados diferentes factores de crecimiento.

Se ensayaron 12 diferentes combinaciones de esos factores y se utilizaron cinco cepas de un lactobacilo aislado de ma - cerado de maíz (*Lactobacillus Delbrückii*) por la Dra. Pisarello, y la cepa del *Lactobacillus casei* usada en las pruebas descritas anteriormente (ver cuadro 1).

Las combinaciones de factores son las siguientes:

FACTORES		CEPAS CON BUEN CRECIMIENTO (GRADO 3 O MAS)	
Medio	Presentes	Ausentes	
Medio 1	ninguno	todos	ninguna
Medio 2	riboflavina	Ac. nicotínico anaurina, biotina, pantotenato de Ca, ac. p-amino benzoico	L. casei
Medio 3	ac. nicotínico, piridoxina, ac. p-amino benzoico, riboflavina	pantotenato de Ca, anaurina, biotina	L. casei, 7
Medio 4	ac. nicotínico, piridoxina, Pantotenato de Ca, riboflavina	p-amino benzoico, anaurina, biotina	L. casei, 10
Medio 5	piridoxina, pantotenato de Ca, p-amino benzoico, riboflavina	ac. nicotínico, anaurina, biotina	L. casei, 10
Medio 6	ac. nicotínico, p-amino benzoico, pantotenato de Ca, riboflavina	piridoxina, anaurina, biotina	L. casei, 2, 9, 10
Medio 7	anaurina, biotina, pantotenato de Ca, riboflavina, ac. nicotínico, piridoxina, ac. p-amino benzoico	ninguno	L. casei, 2, 6, 10
Medio 8	anaurina, biotina, ac. nicotínico, piridoxina, ac. p-amino benzoico	riboflavina	ninguno
Medio 9	ac. nicotínico, piridoxina, pantotenato de Ca, p-amino Benzoico	riboflavina, anaurina, biotina	ninguno

FACTORES		CEPAS CON BUEN CRECIMIENTO (GRADO 3 O MAS)
	Presentes	Ausentes
Medio 10	ac. nicotínico, Piridoxina, pantotenato de Ca, ac. p-amino benzóico, aneurina, riboflavina	Biotina L. casei, 2, 6, 7, 9, 10
Medio 11	ac. nicotínico, piridoxina, pantotenato de Ca, ac. p-amino benzóico	Biotina, riboflavina 2
Medio 12	ac. nicotínico, pantotenato de Ca, ac. p-amino benzóico, riboflavina, biotina, piridoxina	aneurina L. casei, 6, 7

MEDIO BASICO DE BARTON-IRICHE

M E D I O	7	8	9	10	11	12
Cepas	24 hs 96 hs	24 hs 96 hs	24 hs 96 hs	24 hs 96 hs	24 hs 96 hs	24 hs 96 hs
2	♦ ♦♦♦	♦ ♦♦	♦ ♦	♦ ♦♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦
6	♦♦♦♦	♦ ♦♦	♦ ♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦
7	♦ ♦♦	♦ ♦♦	♦ ♦♦	♦♦♦♦♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦
9	♦ ♦♦	♦ ♦♦	♦ ♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦
10	- ♦♦♦	♦ ♦♦	♦ ♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦
L. casol	♦♦♦♦ ♦♦♦♦	♦ ♦♦	♦ ♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦
	♦ ♦♦♦	♦ ♦♦	♦ ♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦	♦♦♦♦

Aunque sería necesario un examen más minucioso y cuantitativo del problema, algunos hechos resultan suficientemente evidentes para que se puedan extraer conclusiones provisorias por lo menos, y que se exponen a continuación. Sería necesario además utilizar algunas combinaciones de factores que no aparecen en el cuadro 1.

- a) El crecimiento del *Lactobacillus casei* tiene lugar en todos los medios en los que existe la riboflavina. Prácticamente los otros factores no influyen de manera muy evidente. La excepción parece constituirla la biotina cuya presencia reduce un poco el crecimiento. Tampoco permite el crecimiento del *Lactobacillus casei* la asociación de los 6 factores utilizados además de la riboflavina.
- b) Las 5 cepas de *Lactobacillus Delbrückii* no se comportan de manera idéntica y parecería que sus requerimientos nutritivos fueran algo diferentes a pesar de provenir las distintas cepas de un mismo material original. Es evidente que la riboflavina sola no es capaz de asegurar el desarrollo del *Lactobacillus Delbrückii*, pero en su ausencia no existe crecimiento alguno de tal modo que debe ser considerado factor esencial de su crecimiento.
- c) El mejor resultado para el crecimiento del *Lactobacillus Delbrückii* se ha logrado por la presencia de 6 factores a saber ácido nicotínico, pantotenato de Ca, Cl-piridoxina, ácido p-amino benzoico, aneurina y riboflavina.

- d) La presencia de biotina es desfavorable para el buen crecimiento del *Lactobacillus Delbrückii*.
- e) Parecería que la aneurina constituye un factor importante de crecimiento.

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE CIERTOS MICROORGANISMOS
EN LAS FRACCIONES SOLUBLES E INSOLUBLES DEL EXTRACTO DE
LEVADURA EN ALCOHOL

Las copas Nº 2, 6, 7, 9 y 10 (*L. Delbrückii*) conjuntamente con el *Lactobacillus casei* fueron sembrados en un medio constituido por la porción insoluble y la soluble en alcohol, del extracto de levadura; con una concentración final de 0.6 %.

Los medios constituidos por la parte insoluble al 0,6 % y la soluble al 0,6 % fueron ensayados con y sin el agregado de glucosa así como la mezcla de las 2 partes.

En la hoja siguiente está el cuadro con los datos obtenidos donde puede apreciarse que la parte insoluble más glucosa permite el crecimiento de las bacterias sembradas, siendo menor que en la soluble. La mezcla de los 2 medios más glucosa da resultados muy parecidos a la parte insoluble más glucosa.

De donde puede deducirse que la parte soluble en alcohol es un medio incompleto.

La siembra fue efectuada con una gota de suspensión de bacterias lavadas en solución fisiológica estéril mediante una pipeta Pasteur.

Cepas	Soluble	Soluble + glucosa	Insoluble	Insoluble + glucosa	Mescla del soluble e Insoluble	Mescla del 20 luble e inso- luble + gluc.
2	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	-	+++
7	-	-	+	+	+	++
9	-	-	-	+	+	++
10	+	+	+	+++	+	+++
L. casei	+	+	+	+++	+	+++

RESUMEN Y CONCLUSIONES

I

- 1) Se plantea, describe y analiza el problema de la determinación de las vitaminas del grupo B.
- 2) Se examina con mayor detalle los métodos microbiológicos para la medida de dichas vitaminas.
- 3) Se decide la aplicación de un método para la determinación de la riboflavina y se lo aplica a diferentes muestras.
- 4) Se analiza la influencia de los factores de crecimiento del *L. casei* para el *L. Delbrückii*.

II

- 1) Es evidente la ventaja de los métodos microbiológicos sobre los fundados en el uso de animales para la determinación de las vitaminas.
- 2) El método de Barton-Wright fué preferido a los de Snell-Strong y de la Pharmacopea Americana (U.S. Ph.XII) por sus resultados más uniformes.
- 3) La aplicación del método elegido ha permitido obtener resultados muy uniformes y las cepas son utilizables para la determinación cuantitativa; basta el examen de las curvas standard para justificarlo.

Ana Rossi

INDICE

	<u>Página</u>
<u>CAPITULO I</u> - Introducción. Los métodos. Enumeración de las vitaminas del complejo B. Métodos biológicos para la determinación de las vitaminas del complejo B	1 a 10
<u>CAPITULO II</u> - Las bacterias y su comportamiento frente a los factores de crecimiento.	11 a 15
<u>CAPITULO III</u> - Métodos microbiológicos para la determinación cuantitativa de las vitaminas del complejo B. Generalidades sobre la riboflavina. Especificidad de la riboflavina.	16 a 33
<u>CAPITULO IV</u> - Métodos de determinación cuantitativa de la riboflavina. Instrumental requerido. Propiedades de las bacterias lácticas. Preparación de reactivos. Composición de los distintos medios. Preparación del extracto en ensayo.	34 a 52
<u>CAPITULO V</u> - Parte experimental. Construcción de la curva standard. Distintos métodos de determinación de la riboflavina. Cálculo de la concentración de la riboflavina. Determinación cuantitativa de la riboflavina en distintas sustancias. Ensayos con distintos microorganismos en diversos medios. Comparación del crecimiento de ciertos microorganismos en las fracciones solubles e insolubles en alcohol del extracto de levadura en alcohol.	53 a 85
<u>CAPITULO VI</u> - Resumen y Conclusiones.	57

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

- 1) Waisman, Amer. Dietet. Assoc. J. 18, 363-365 (1942)
- 2) Köcl y Tennis. Ztschr. f. Physiol. Chem. 242; 43.73 (1936)
- 3) Stillar, Keresztöy y Stevens - Amer. Chem. Soc. J. 61, 1237-1242 (1939)
- 4) E. E. Woods - Canadian Chemistry an process industries 26 - 489-553 (1942)
- 5) T. H. Jukes - J. Nutrition, 14, 223 (1937)
- 6) T. H. Jukes - J. Biol. Chem. 117, 11 (1937)
- 7) G. Margolis, L. H. Margolis y S. G. Smith - J. Nutrition, 16, 541 (1938); 17, 63 (1939)
- 8) R. W. Vilter, S. P. Vilter y T. D. Spies - J. Am. Med. Assoc. 112, 420 (1939)
- 9) R. Kohn y G. Wandt - Zsr. 81, 780 (1938)
- 10) H. Chick, M. M. El-Sada y A. N. Warden - Biochem. J. 34, 595 (1940)
- 11) V. du Vigneux, K. Hoffmann y D. R. Melville - J. Am. Chem. Soc. 64, 188 (1942)
- 12) Snell y Peterson 1940 J. Bact. 39, 273; Hutchings 1941 J. Biol. Chem. 141; 521-528
- 13) Ansbacher, Science 93, 164 (1941)
- 14) G. J. Martin, M. R. Thompson y J. de Carvalho - Am. J. Digestive Dis 8, 290 (1941)
- 15) A. Dorfman, S. A. Koser, H. R. Reanna, K. F. Svinzle y F. Saunders Proc. Sec. Exptl. Biol. Med. - 43, 163 (1940)
- 16) T. W. Censor y C. A. Elyehison - J. Biol. Chem. 138, 555 (1941)
- 17) R. C. Bender y G. C. Sullivan - J. Am. Chem. Soc. 59, 1178 (1937)
- 18) P. Györy - J. Biol. Chem. 131, 733 (1939)
- 19) G. Sunde y H. Kungstad - J. Nutrition 19, 321 (1940)
- 20) S. Ansbacher - Science 93, 164 (1941)
- 21) Tatum E. L., Wood H. G. y Peterson W. H. - Biochem. J. 31, 1838 (1936)

- 22) Woods D. D. - Am. Rev. of Microbiology, pág. 114 (1947)
- 23) Snell E. E., Strong F. M. y Petersen V. H. - Biochem. J. 31, 1789-1799 (1937)
- 24) Snell E. E., Strong F. M. y Petersen V. H. - J. Am. Chem. Soc. 60, 2825 (1938)
- 25) Moeller E. F. - Z. physiol. Chem. 260, 246-256 (1939)
- 26) Snell E. E. y Wright L. D. - J. Biol. Chem. 139, 675-686 (1941)
- 27) Moeller E. F. - Z. physiol. Chem. 254, 285-286 (1938)
- 28) Niven C. E. - J. Bact. 47, 343-350 (1944)
- 29) Sarett H. P. y Chaldelin V. H. - J. Biol. Chem. 155, 153-160 (1944)
- 30) Isbell H. J. - J. Biol. Chem. 144, 567-568 (1942)
- 31) Snell y Petersen - J. Biol. Chem. 128 xciv-xcv (1939)
- 32) Snell y Petersen - J. Bact. 39, 273-285 (1940)
- 33) Mitchell H. K., Snell E. E. y Williams R. J. - J. Am. Chem. Soc. 63, 2284 (1941)
- 34) Scheffer y Jung - Compt. Rend. V. Congr. Internat. Tech. et Chem. des Industries Agricoles. Scheveningue 1, 22-34 (1937)
- 35) Schultz, Atkin y Frey - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 35-39 (1942)
- 36) Silverman y Werkman - Soc. Exptl. Biol. and Med. Proc. 38, 823-827 (1938); J. Bact. 38, 25-32 (1939)
- 37) Niven y Suller - J. Biol. Chem. 150, 1-9, (1943)
- 38) Sarett H. P. y Chaldelin V. H. - J. Biol. Chem. 155, 153 (1944)
- 39) Williams y Saunders - Biochem. J. 28, 1887-1893 (1934)
- 40) Palczar y Porter - J. Biol. Chem. 139, 111-119 (1941)
- 41) Hoag E. H., Sarett H. P., Chaldelin V. H. - Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed. 17, 60 (1945)
- 42) Barton y Wright E. C. - Bioch. J. - 38, 314 (1944)
- 43) Williams - Univ. of Texas Pub. 4137, 27-38 (1941)
- 44) Stokes, Larsen, Woodward y Foster - J. Biol. Chem. 150, 17-24 (1943).

- 45) Lourensen, Bahler y Peterson - J. Nutr. 23, 11-21 (1942)
- 46) Snell, Eakin y Williams - J. Amer. Chem. Soc. 62, 175-178 (1940)
- 47) Barton y Wright - Analyst 70, 283 (1945)
- 48) Landy y Dicken - J. Biol. Chem. 146, 109-114 (1942)
- 49) Ishall - J. Biol. Chem. 144, 567-568 (1942)
- 50) Williams - Univ. of Texas Pub. 4137, 27-30 (1941)
- 51) Mitchell y Snell - J. Amer. Chem. Soc. 63, 2284 (1941)
- 52) Knight B.C., J.G. - Vitamins and Hormones, Vol. III pág. 133 (1945)
- 53) Woolley D. W. y Hutchings B.L. - J. Bact. 38, 285 (1939)
- 54) Woolley D. W. y Hutchings B.L. - J. Bact. 39, 287 (1940)
- 55) Schuman R. L. y Farrell M.A. - J. Infectious Diseases 59, 81 (1941)
- 56) Knight B.C., J.G. y Fildes P. - Biochem. J. 24, 1490 (1930)
- 57) Snell E.E., Strong F.M. y Peterson W.H. - J. Bact. 38, 293 (1939)
- 58) Snell E.E. y Strong F.M. - Ind. Eng. Chem. 11, 346 (1939)
- 59) Wood H.G., Geiger C. y Warkman - Iowa State Coll. J. Sci. 14, 367 (1940)
- 60) Wood H.G., Anderson A.A. y Warkman - J. Bact. 36, 201 (1938)
- 61) Daudoroff M. - Enzymologia 5, 239 (1938)
- 62) Dorfman A., Koser S.A., Berman H.B., Savigle K.F. y Saunders F.
J. Infectious Diseases 65, 163 (1939)
- 63) Snell E.E. y Strong F.M. - Enzymologia 6, 186 (1939)
- 64) Snell E.E., Strong F.M. y Peterson W.H. - J. Biol. Chem. 31, 1789-1799 (1937)
- 65) Speakman - J. Biol. Chem. 58, 395-413 (1923)
- 66) Snell E.E. y Ramsefeld A.H. - J. Biol. Chem. 157, 475-489 (1945)
- 67) Woolley D.D. - Am. Rev. of Microbiology pág. 115 (1947)
- 68) Snell E.E. y Strong F.M. - Enzymologia 6, 186 (1939)

- 69) The lactic acid bacteria Orla-Jensen, pág. 89 (1919)
- 70) Weed E. C. - Nature 155, 632 (1946)
- 71) Scott M.L., Randall F.E. y Hessel E.H. - J. Biol. Chem. 141,325
(1941)
- 72) Strong F.H. y Carpenter L.E. - Ind. Eng. Chem. Anal.Ed. 14,909

