



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

4
20j

Evaluación de métodos analíticos para cuantificar azúcares reductores en medios de fermentación empleados en procesos biotecnológicos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Químico-Farmacéutico-Biólogo
P R E S E N T A
Victor Martín Bolaños García

x



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

- i) RESUMEN
- ii) PROLOGO
- iii) INTRODUCCION

PRIMERA PARTE

- iv) OBJETIVOS
- v) CAPITULO PRIMERO: CONCEPTOS FUNDAMENTALES
 - 1. Quimica de carbohidratos.
 - 2. Metabolismo microbiano de carbohidratos.
 - 3. Tecnologia de Fermentaciones.
 - 4. Métodos analíticos para la cuantificación de carbohidratos.
 - 5. Método de optimización de Box-Wilson.
 - 6. Definiciones en Validación de métodos analíticos.
- vi) CAPITULO SEGUNDO: METODOLOGIA
- vii) CAPITULO TERCERO: ELECCION DE METODOS

SEGUNDA PARTE

- viii) RESULTADOS Y DISCUSION
 - 1. Evaluación de los métodos analíticos elegidos.
 - 1.1. Método A. Determinación con ácido sulfúrico-fenol.
 - 1.2. Método B. Determinación con 2-bifenilamina.
 - 1.3. Método C. Determinación con ferricianuro.
 - 1.4. Método D. Determinación con ácido 3,5-dinitrosalicílico.
 - 1.5. Discusión.
 - 2. Estudio de los factores que afectan la determinación de azúcares reductores con reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico.

- 2.1. Introducción.
- 2.2. Efecto de la Temperatura.
 - 2.2.1. Sobre la velocidad de disolución del reactivo.
 - 2.2.2. En la preparación del reactivo.
 - 2.2.2.1. Sobre la intensidad del color producido.
 - 2.2.2.2. Sobre la cuantificación de azúcares reductores.
 - 2.2.3. Discusión.
- 2.3. Efecto de la composición del reactivo.
 - 2.3.1. Debido a la presencia de sulfito sódico.
 - 2.3.2. Debido a la concentración del tartrato de sodio y potasio.
 - 2.3.3. Debido a la concentración del sulfito de sodio.
 - 2.3.4. Debido a la concentración de hidróxido de sodio.
 - 2.3.5. Debido a la concentración del ácido 3,5-dinitrosalicílico.
 - 2.3.6. Debido a la concentración, de fenol.
 - 2.3.7. Discusión.
- 2.4. Estabilidad del color en la reacción.
 - 2.4.1. Respecto al tiempo.
 - 2.4.2. Discusión.
3. Optimización del método del DNS empleando el método de Box-Wilson.
 - 3.1. Tratamiento de datos y resultados.
 - 3.2. Discusión.
4. Prevalidación del método analítico que ocupa reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico.
 - 4.1. Evaluación experimental de parámetros.
 - 4.1.1. Especificidad.

4.1.2. Linearidad.

4.1.3. Limite de Cuantificación.

4.1.4. Exactitud.

4.1.5. Precisión.

4.1.5.1. Repetibilidad.

4.1.5.2. Reproducibilidad.

4.2. Discusión.

5. Aplicación del método del DNS en procesos biotecnológicos.

5.1. En medios de fermentación para el cultivo de hongos filamentosos.

5.2. En medios de fermentación para el cultivo de bacterias recombinantes.

5.3. Otras aplicaciones del DNS.

ix) DISCUSION GENERAL DE RESULTADOS

x) CONCLUSIONES

xi) APENDICES

xii) REFERENCIAS

RESUMEN

En el presente trabajo fueron elegidos cuatro métodos analíticos para aplicarse a la determinación de azúcares reductores en varios medios de fermentación comúnmente empleados en procesos biotecnológicos. La elección de estos métodos (determinación con ácido sulfúrico-fenol; determinación con 2-bifenilamina; determinación con ferricianuro y determinación con reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico) se basó en los siguientes criterios: su factibilidad para ser aplicados a las muestras de interés, resultar sencillos, rápidos, económicos y poderse manejar un gran número de muestras a la vez.

Los cuatro métodos analíticos -todos ellos colorimétricos- se ensayaron en ocho distintos medios de fermentación cuya composición promedio es ampliamente utilizada para muchos procesos biotecnológicos. Los mejores resultados fueron logrados con el método que ocupa el reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Posteriormente este método analítico fue estudiado en detalle, evaluándose una serie de factores que determinan su comportamiento, como son: el de las temperaturas en la preparación del reactivo y la determinación misma de azúcares reductores, así como la composición del reactivo y la estabilidad del color producido en la reacción. De esta manera se establecieron una serie de condiciones para lograr los mejores resultados. Luego el método fue optimizado respecto al volumen de reactivo a emplear y en los tiempos de reacción y reposo de las muestras, para lo cual se siguió la metodología propuesta por Box y Wilson. Una vez optimizado el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, fueron hechos estudios pre-validatorios al

mismo. evaluándose los parámetros: especificidad. linealidad. límite de cuantificación. exactitud. repetibilidad y reproducibilidad. Se encontró que el método cumple satisfactoriamente con los anteriores parámetros.

Finalmente, se evaluó la aplicabilidad de este método en la determinación de azúcares reductores utilizados como fuente de carbono en las fermentaciones de 1) hongos filamentosos (*Aspergillus niger*) productores de ácido cítrico y 2) en la producción de la enzima penicilino-amidasa por bacterias modificadas vía ingeniería genética (recombinantes), obteniéndose resultados también satisfactorios.

PROLOGO

En el último lustro han aparecido en el mercado una amplia gama de productos nuevos de origen biológico que se caracterizan por tener algún uso o forma de actividad biológica. De manera simultánea se han desarrollado nuevos procesos biológicos para obtener productos ya existentes. Los métodos para la elaboración de tales productos emplean una amplia gama de tecnologías, que incluyen la extracción y aislamiento de fuentes naturales, fermentaciones microbianas, ingeniería genética, cultivo de tejidos, síntesis química y enzimática y recientemente ingeniería de proteínas. Todo ello ha derivado en el concepto actual de Biotecnología. Más qué es la Biotecnología? En un sentido amplio se ha definido como la utilización de moléculas obtenidas biológicamente, estructuras, células u organismos para llevar a cabo procesos específicos (Wasserman et al, 1988). La Federación Europea de Biotecnología (EFB) la definió como el uso integrado de la Bioquímica, la Microbiología y la Ingeniería para lograr las aplicaciones tecnológicas de las capacidades de los microorganismos, los cultivos de tejidos y partes derivadas de ellos (Knorr, 1987). Se ha insistido en que los aspectos de genética molecular, fisiología y bioquímica celular y los principios de transferencia de masa, diseño de reactores, etc., deben aglutinarse bajo objetivos comunes para fortalecer a la Biotecnología de manera integrada y lograr consolidarla a nivel industrial (Aiba, 1984; Ertola, 1985). La Biotecnología es una disciplina resultante de la sinergia de diversas ciencias y éstas, como sucede con el arte, constituyen puntos álgidos de la historia del hombre. Por ello merece resaltarse aquí el sentido

humanista del poema escrito por el filósofo alemán Schiller con que se inició la prologación de este trabajo. ¡Cuánto de artista guarda cada científico!.

Es el deseo personal de este autor -deseo que afortunadamente comparte con muchos más- lograr generar una ciencia siempre dirigida hacia el beneficio común. Esto que parece a simple vista un ideal más, quizá anacrónicamente romántico, deja de parecerlo cuando se reconoce que la ciencia es un proceso social cuya especificidad es la producción del conocimiento y que la actividad científica constituye y está a su vez condicionada, tanto histórica como socialmente, por una determinada estructura cultural. La cultura a su vez está caracterizada por creencias y valores intrínsecos, epistémicos e instrumentales (Niiniluoto, 1990).

Así entonces, la Biotecnología (y la ciencia en general) se convierten en los motores del desarrollo, tan anhelado por todos. Pero, paradójicamente, la puerta que conduce al desarrollo puede convertirse en la misma que refuerce nuestra dependencia. En toda Latinoamérica -y obviamente incluido México- el panorama resulta sombrío: nuestros países exportan gente calificada, información científica útil, productos manufacturados baratos, materias primas de sectores económicamente estratégicos, dinero, etc., y son al mismo tiempo importadores obligados de conocimientos, tecnologías, bienes de capital, productos químicos y manufacturados de alto valor agregado, productos industriales de tecnologías de punta, etc. (Goldstein, 1989). Asimismo se han reconocido carencias y limitaciones en aspectos esenciales para el desarrollo biotecnológico, como por ejemplo, dificultades para

definir proyectos específicos, número insuficiente de recursos humanos, infraestructura inexistente o inadecuada, presupuestos pequeños y diversificados en ciencia y tecnología, desvinculación entre investigación e industria y poca experiencia en desarrollo tecnológico (Quintero, 1985).

Está claro que el primer paso para resolver los problemas, por más graves y difíciles que estos sean, es admitir que existen. Bien vale la pena entonces hacer una profunda reflexión sobre el curso que la humanidad ha tomado. Enfermedades tan graves y arcaicas como la desnutrición y parasitosis, presentes en buena parte de la población mundial, contrastando con los astronómicos gastos militares hechos por las potencias, son dolorosas realidades que no podemos soslayar. Hoy día, cuando algunos regímenes totalitaristas han sucumbido y se percibe un clima de distensión, la doctrina neoliberal se adjudica todos los triunfos, pregonando la apertura de las economías hacia el libre mercado y la conformación en bloques continentales de "desarrollo". No obstante debemos ser cautelosos, pues al mismo tiempo grandes problemas se agudizan, de tal forma, que incluso se exige la creación de un nuevo orden económico mundial. Las economías del libre mercado propuestas por los países desarrollados nunca han sido aplicadas por ellos mismos en sus propias naciones (Galeano, 1989) y no hay razón alguna para pensar que el embate neoliberal será definitivo e irreversible en estos tiempos del postmodernismo (cualquier cosa que esto signifique).

Evitando en lo posible la parálisis por el análisis, debe plantearse un proyecto nacional de desarrollo acorde con nuestra

realidad de país dependiente. De aquí la capital pregunta ¿Qué tipo de Biotecnología hacer? . En primer lugar, considero un gran avance el evitar caer en la trampa de generar investigación para "cerrar la brecha tecnológica" pues no se ve cómo alcanzar a los países desarrollados. Es obvio que si nosotros avanzamos en su mismo sentido, ellos no se quedarán parados a esperarnos y, más aún, ¿vale la pena seguir la senda marcada por los países desarrollados? ¿Es el único o el mejor modelo propuesto?. De responder afirmativamente, estaremos de nueva cuenta haciendo ciencia y tecnología imitativa y por lo tanto, desarrollando la dependencia (eso sí, exitosamente). Tunnerman lo ha señalado oportunamente: "las naciones que no realizan investigaciones científico-tecnológica propias, no llegan a constituirse en protagonistas de su destino". La actual agonía del planeta (que según algunos grupos de físicos es ya termodinámicamente irreversible) y una humanidad cada vez más voraz, son contundentes réplicas para quienes ven en los países desarrollados un modelo ideal de hacer las cosas. Claro está que tampoco la respuesta es abandonar las investigaciones de frontera, pero lo que sí implica es dejar de mirar siempre hacia afuera, aguardando por alguien que venga a resolver nuestros problemas.

Los grandes cambios que se están dando en la ciencia, tecnología y los sistemas productivos hacen pensar en la generación de transformaciones cualitativas sustanciales; una revolución tecnológica que articula ciencia, tecnología y producción en una forma que antes no existía. Esta situación

desemboca en una revolución cultural que obliga a buscar nuevas formas de interpretar las relaciones entre investigación científica, desarrollo tecnológico, aparato productivo y por supuesto, el carácter de cada uno de ellos (Campos, 1991).

En México, nuestras milenarias culturas nos ofrecen insospechadas alternativas para resolver los problemas más urgentes. La conjunción de la medicina tradicional, la elaboración de alimentos con alto valor nutritivo, la búsqueda de nuevos principios activos o sus precursores y compuestos de interés industrial en nuestra riquísima flora y fauna utilizando procesos biotecnológicos de primera a tercera generaciones, son una alternativa a todas luces viable. Su promoción ayudaría incluso a detectar aquellos sectores en los cuales México podría competir internacionalmente, si esa estrategia es mantenida como directriz dentro del actual esquema gubernamental de desarrollo.

Reconocida como Biotecnología apropiada (Quintero, 1985) al mismo tiempo se estaría conformando una cultura científica nacional, lo que bien podría redundar en una mayor participación (y reconocimiento) por parte de la sociedad. Se ha insistido en evitar hacer Biotecnología a "puertas cerradas" (Yoxen, 1984). Ya existen esfuerzos en otras latitudes para atraer a la opinión pública y hacerla participe del desarrollo biotecnológico (Phillip, 1987); el grupo Science for the People es un buen ejemplo de esto.

Las ideas anteriormente expuestas requieren de mucho más tiempo para discutirse pero queda aquí sólo la intención de someterlas al juicio crítico de ustedes. Dada mi formación académica de químico, tengo la convicción de que, así como es

posible el continuo perfeccionamiento de la materia, es una realidad el continuo perfeccionamiento del ser humano. Puntualizo reconociendo que es en la generación de una Biotecnología alternativa donde este trabajo quiere ubicarse, no pretendiendo ser sino uno más de los millares de esfuerzos que se dedican para preservar la vida en la Tierra, vía la explotación racional de los recursos (y aquí la razón del porqué Biotecnología) manteniendo la mirada en alto, buscando un progreso con sentido humanista, esencia de luz que es nuestra propia esencia.

México, 1992.

INTRODUCCION

Como en todo proyecto de investigación o de producción biotecnológico, resulta imprescindible contar con un método analítico confiable que permita la correcta determinación de algunos de los sustratos que son consumidos y/o de los productos de reacción generados por el (los) microorganismo(s) utilizado(s).

Por otra parte, la formulación de medios de cultivo conteniendo una alta diversidad de compuestos es muy frecuente en tecnología de fermentaciones, una de las áreas más importantes de la biotecnología. En virtud de que la búsqueda de nuevos sustratos es uno de los aspectos de la tecnología de fermentaciones que está en constante avance, la implementación de métodos analíticos adecuados para cuantificar moléculas específicas en estos sistemas es una labor también de continuo desarrollo (Crueger y Crueger, 1984).

Son muchos los métodos analíticos reportados para cuantificar azúcares reductores, pero no todos pueden emplearse en cualquier tipo de muestra. Esto porque comúnmente llegan a tenerse interferencias en la determinación debidas a la presencia de otros componentes.

De todos los compuestos químicos presentes en un medio de fermentación de microorganismos, revisten especial importancia aquellos empleados como fuente de carbono. Su determinación precisa arroja valiosa información sobre el comportamiento fisiológico del microorganismo mantenido en cultivos, por lo que esto se utiliza como un parámetro fundamental en fermentaciones.

De todos los sustratos utilizados como fuente de energía, tradicionalmente se han empleado carbohidratos en la industria de las fermentaciones. Principalmente por razones económicas, suele usarse glucosa o sacarosa como únicas fuentes de carbono, aunque existen muchos otros azúcares, de carácter reductor como la glucosa, que son empleados con frecuencia (Rehm, 1980).

En particular, la implementación de métodos analíticos para cuantificar azúcares en estos sistemas se ha ido desarrollando hacia el campo del análisis instrumental. Un ejemplo claro es el creciente uso de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Sin embargo, en general estos modernos métodos de análisis son muy caros, no siempre se cuenta con ellos en cualquier laboratorio, se necesita de personal capacitado para su manejo y requieren un mantenimiento constante y costoso.

Respecto a los métodos químicos de análisis, no hay muchos reportados en la literatura que se apliquen a la determinación en medios de fermentación y en general su modo específico de empleo e incluso la composición y preparación de los reactivos utilizados varían grandemente, por lo que es difícil reproducir los resultados. Como consecuencia de esto, se presentan en ocasiones comportamientos inesperados que las más de las veces son atribuidos al microorganismo en particular que se estudia. En este contexto, la búsqueda de nuevos y mejores métodos químicos de análisis, que sean al mismo tiempo rápidos, económicos y confiables se vuelve realmente necesaria. El presente trabajo de tesis es una aportación en este sentido.

OBJETIVO

Encontrar un método analítico que permita la cuantificación de azúcares reductores en medios de fermentación utilizados en Procesos Biotecnológicos; luego estandarizarlo, optimizarlo y prevalidarlo para garantizar los mejores resultados.

Objetivos particulares

1. Realizar una revisión bibliográfica de los métodos químicos reportados para la cuantificación de azúcares reductores eligiendo luego los que teóricamente puedan ser útiles para nuestros intereses.
2. Ensayar experimentalmente cada uno de los métodos elegidos en soluciones acuosas de azúcares reductores y de cada uno de los componentes de los medios de fermentación empleados, para evaluar su especificidad y linealidad.
3. Evaluar el efecto de algunas variables que afectan la determinación de azúcares reductores para el método elegido con objeto de estandarizarlo.
4. Optimizar el método analítico elegido mediante criterios de matemática estadística.
5. Prevalidar el método analítico elegido evaluando los parámetros: Linealidad, Precisión, Exactitud, Límite de detección y Sensibilidad cuando se aplica a la cuantificación de azúcares reductores en medios de fermentación.
6. Evaluar la aplicabilidad del método elegido en procesos biotecnológicos como son: fermentaciones de hongos filamentosos y bacterias recombinantes.

PRIMERA PARTE

PARTE

"El eterno misterio del mundo es su comprensibilidad"

(The Evolution of Physics)

Albert Einstein

CAPITULO PRIMERO
CONCEPTOS FUNDAMENTALES

1. Química de carbohidratos
2. Metabolismo microbiano de carbohidratos
3. Tecnología de Fermentaciones
4. Métodos analíticos para la cuantificación de carbohidratos.
5. Método de Optimización de Box-Wilson.
6. Definiciones en Validación de métodos analíticos.

Quien no conoce nada, no ama nada.

Quien no puede hacer nada, no comprende nada.

Quien nada comprende, nada vale.

Pero quien comprende, también ama, observa, ve...

Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa,

más grande es el amor...

Quien cree que todas las frutas maduran

al mismo tiempo que las frutillas

nada sabe acerca de las uvas.

Philippus Aureolus Theophrastus

Bombastus Ab Hohenheim

(Paracelso) (1493-1541)

CONCEPTOS FUNDAMENTALES

1. Química de Carbohidratos.

Carbohidrato significa literalmente hidrato de carbono. El nombre deriva de las investigaciones hechas por los químicos antiguos, quienes encontraron que calentando azúcares por periodos prolongados de tiempo en un tubo destapado se obtiene un residuo negro (carbón) y gotas de agua condensada en las paredes del tubo. Posteriormente, los análisis químicos de azúcares y otros carbohidratos indicaron que sólo contienen Carbono, Hidrógeno y Oxígeno y que muchos de ellos poseen la fórmula general $C_x(H_2O)_y$. Ahora se conocen algunos carbohidratos que contienen además nitrógeno y azufre (Campbell, 1991).

Los carbohidratos definitivamente no son compuestos hidratados (como es el caso de muchas sales inorgánicas). Actualmente el nombre de carbohidrato se emplea para designar una amplia clase de compuestos que son polihidroxialdehidos o cetonas o sustancias que rinden dichos compuestos en una hidrólisis ácida (Lenhinger, 1990). Es de destacar que los carbohidratos son los principales constituyentes de muchas plantas, comprendiendo del 60 al 90% de la masa seca (principalmente como celulosa). En contraste, los tejidos animales contienen una cantidad comparativamente pequeña de carbohidratos (menos del 1% en humanos) (Candy, 1980).

Los carbohidratos tienen pesos moleculares comprendidos entre menos de 100 hasta más de un millón de g/mol y, en general, son sólidos blancos, difícilmente solubles en disolventes orgánicos pero, excepto para algunos carbohidratos de alto peso molecular, solubles en agua (White, Handler, Smith, Hill y Lehman, 1983).

Los carbohidratos se clasifican de acuerdo a sus productos

durante una hidrólisis ácida y se reconocen tres categorías principales:

- a). Los monosacáridos o azúcares simples, los cuales no pueden ser degradados a moléculas más pequeñas mediante hidrólisis.
- b). Los disacáridos, que rinden dos moléculas de monosacáridos en una hidrólisis ácida.
- c). Los polisacáridos, que rinden muchas moléculas de monosacárido por hidrólisis.

El gliceraldehído y la dihidroxicetona, únicos monosacáridos posibles que contienen tres átomos de carbono, se denominan triosas. Es de destacar el único centro asimétrico en el gliceraldehído (llamado carbono quiral) el cual da lugar a dos formas conformacionales diferentes o enantiómeros.

2. Metabolismo microbiano de carbohidratos.

La serie de reacciones mediante las cuales es metabolizado un nutriente recibe el nombre de sistema metabólico.

Se reconocen dos tipos principales de sistemas metabólicos, el denominado anabólico que conduce a incrementar la complejidad molecular del nutriente y otro llamado catabólico mediante el cual se hace decrecer la complejidad molecular del nutriente (Watson, et al., 1987).

Los sistemas anabólicos suelen conducir a la síntesis de nuevos constituyentes celulares, mientras que los sistemas catabólicos dan como resultado la formación de compuestos de bajo peso molecular, de los cuales unos son productos de desecho del metabolismo y son excretados, mientras otros sirven de

precursores en las reacciones biosintéticas. por lo que se canalizan hacia los sistemas anabólicos. Resulta entonces evidente la estrecha interrelación que existe entre los sistemas anabólicos y catabólicos del metabolismo pero son considerados separadamente al estudiar las reacciones que comprenden. La figura 1 muestra esquemáticamente las principales características del metabolismo microbiano para ilustrar el punto anterior.

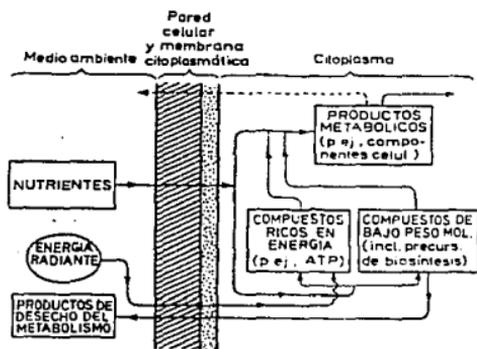


Fig. 1 Principales características del metabolismo microbiano. (Tomado de Volk y Wheeler, 1988).

Los microorganismos pueden emplear como fuentes de energía una amplia gama de compuestos orgánicos oxidables los cuales durante el catabolismo forman compuestos de dos, tres y cuatro átomos de carbono. Cuando se intenta cuantificar un solo tipo de compuestos de los muchos que el metabolismo microbiano genera, como ocurre durante una fermentación, es importante conocer sus sistemas

anabólicos y catabólicos para así poder diseñar el método analítico adecuado.

Cuando se trata del metabolismo productor de energía en los organismos quimioorganotróficos, se involucran inmediatamente los conceptos fermentación y respiración. A lo largo de la historia se les han asignado significados diferentes a estos términos pero en la actualidad los fisiólogos microbianos emplean la palabra fermentación para referirse a aquellos sistemas productores de energía en los que actúan, tanto de dadores como de aceptores de electrones, compuestos orgánicos (Neway, 1989). Algunos microorganismos obtienen energía a partir de oxidaciones en las que actúan como aceptores finales de electrones compuestos inorgánicos y este proceso se denomina respiración anaerobia para distinguirlo de la respiración aerobia en la que el oxígeno actúa como aceptor final de electrones (Moat y Foster, 1988).

Los microorganismos frecuentemente utilizan como fuente de carbono los carbohidratos que muy comunmente se formulan en los medios de cultivo en laboratorios, por esta razón no es sorprendente el hecho de que los mecanismos por los cuales estos compuestos desprenden energía hayan sido estudiados profusamente (Becker, Jeffrey, Caldwell, y Zachgo, 1990).

A pesar que la investigación sobre el catabolismo de los carbohidratos por los microorganismos ha progresado mucho a lo largo de los últimos 80 años, todavía se están descubriendo nuevas reacciones y vías. Probablemente lo más ilustrativo sea considerar a cuatro vías como las principales para la degradación

de carbohidratos (Röse, 1977). Existen otras series de reacciones que permiten a otros carbohidratos y compuestos relacionados con ellos entrar a estas vías metabólicas principales; dichas reacciones pueden considerarse como vías accesorias a las rutas catabólicas principales, las cuales son:

a) Ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). La figura 2 muestra la serie de reacciones del sistema EMP hasta la formación del piruvato. La reacción característica de la vía EMP es la escisión de la fructosa 1,6-difosfato por la enzima aldolasa para dar una mezcla de triosas fosfato, por lo que a esta vía se le denomina también de la hexosa difosfato. Ambas triosas fosfato se convierten después en piruvato. Durante esta conversión se forman dos moléculas de ATP. Estas son fosforilaciones a nivel del sustrato. La ruta EMP parece ofrecer solamente un rendimiento aproximado del 30% como proceso productor de energía (Stanier, Graham, Weelis y Page, 1986; Rawn, 1989).

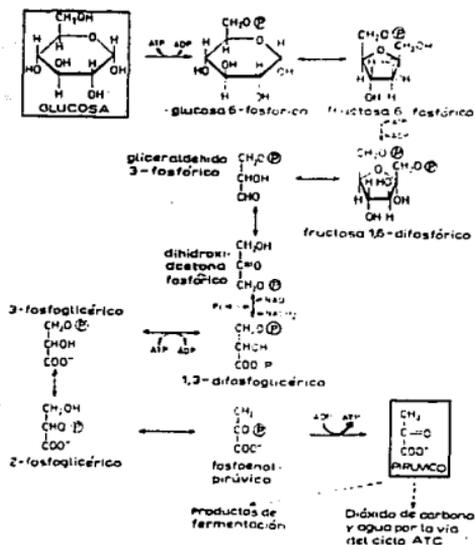


Fig. 2. Reacciones bioquímicas de la vía EMP mostradas hasta la formación del piruvato.

b) Ruta del fosfogluconato o desviación del monofosfato de hexosa. Entre los años 1940-1960, los trabajos de Otto Warburg en Berlín, Frank Dickens en Londres y Bernard Horecker y Ephraim Racker en E.U. establecieron la existencia de una vía de degradación de carbohidratos que implica la formación de hexosas monofosfato y de pentosas fosfato pero que también utiliza algunas reacciones de la ruta EMP. Esta vía puede entonces considerarse como una "desviación" de la vía EMP y suele

denominarse vía de la hexosa monofosfato (HMP), de la pentosa fosfato o ruta de Warburg-Dickens. La Figura 3 muestra el ciclo de reacciones que componen una versión de esta vía. Generalmente se admite que en la mayoría de los microorganismos la ruta EMP no es la principal para la producción de energía ya que sólo tiene la mitad de eficacia que la vía EMP, sino que se utiliza principalmente para proporcionar pentosas fosfato necesarias para la síntesis de nucleótidos y NADPH como fuente de poder reductor (Jones, 1979).

2

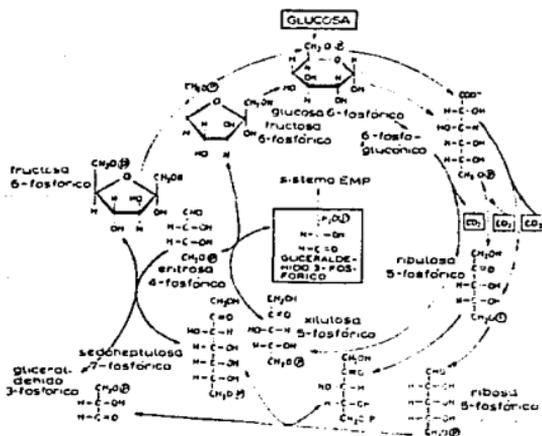


Fig. 3. Reacciones bioquímicas del sistema HMP.

c) Vía de la fosfoacetolasa. Algunas bacterias catabolizan la glucosa mediante la utilización de ciertos sistemas en los que interviene la acción de una fosfoacetolasa, enzima que separa acetilfosfato de un compuesto C o C fosforilado. Esta ruta

5 6

se descubrió en *Leuconostoc mesenteroides* y se muestra en la figura 4. La reacción crucial de esta vía es la catalizada por la fosfoctolasa: la escisión de la xilulosa 5-fosfato a acetilfosfato y gliceraldehído 3-fosfato. Como medio para sintetizar ATP, esta ruta es todavía menos eficaz que el EMP porque el catabolismo de una molécula de glucosa conduce a la síntesis de sólo una molécula de ATP (Holland, Knapp y Shoesmith, 1987).

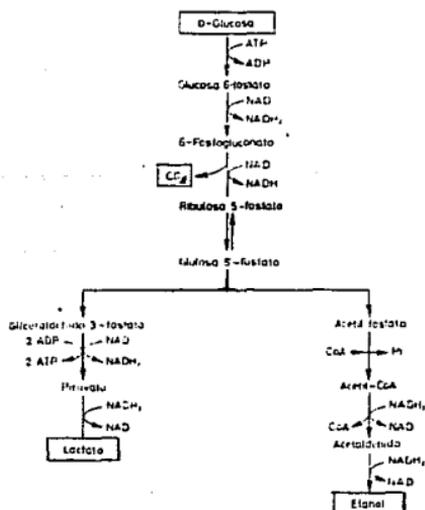


Fig. 4. Reacciones bioquímicas de la ruta de la fosfoctolasa.

d) Vía de Entner-Doudoroff. La cuarta ruta principal para la degradación de carbohidratos en los microorganismos se encontró por primera vez en *Pseudomonas saccharophila*. La vía Entner-Doudoroff produce, al igual que en la vía HMP, sólo una molécula de ATP por cada molécula de glucosa. Sin embargo, a diferencia de las demás rutas principales, es utilizada solamente por un número limitado de microorganismos, la mayoría de las cuales son bacterias del género *Pseudomonas*. Al ser esta ruta utilizada por tan pocos microorganismos, se ha pensado que estos pueden constituir una línea evolutiva separada (Holloway, 1988).

Los microorganismos difieren mucho entre sí en cuanto a la utilización de las vías principales para la degradación de carbohidratos. Por ejemplo, durante la fermentación de glucosa por *Saccharomyces cerevisiae*, casi toda la glucosa se metaboliza por vía EMP pero en cuanto la levadura se crece anaeróticamente, se canaliza hacia la ruta HMP hasta un 30% de la glucosa. (Candy, 1980).

Cabe señalar que las reacciones posteriores que puede sufrir el piruvato varían considerablemente según los distintos microorganismos y, especialmente en las bacterias, conducen a la formación de productos de fermentación característicos, como alcoholes y ácidos. Entre dichas fermentaciones destacan 1) la alcohólica, producida por levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, especies de *Fusarium*, miembros de las mucorales y algunas pocas bacterias (Fassatiava, 1986); 2) fermentación láctica, por *Lactobacillus* y *Rhizopus* como ejemplo (Tsao, 1984); 3) fermentación propiónica por especies de *Propionibacterium* y *Clostridium* (Best, 1985); 4) fermentación fórmica, por

ejemplo en *Escherichia coli*, *Aerobacter*, *Serratia* y especies de *Bacillus* (Davis, Dulbecco, Eisen y Ginsberg, 1985).

3. Tecnología de Fermentaciones.

3.1. Clasificación de las fermentaciones.

En una fermentación se reproducen las condiciones fisicoquímicas y bioquímicas que permiten el mejor crecimiento de los microorganismos cultivados. La diversidad de sistemas utilizados en fermentaciones a conducido a clasificarlos de acuerdo con diversos criterios. Por ejemplo, en base al tipo de cultivo se clasifican en a) Cultivo en lote, y aquí el tipo más importante lo constituye el cultivo sumergido; y b) cultivo continuo. En el cultivo en lote la composición del medio cambia a un cierto ritmo y consecuentemente el número y masa de las células en el cultivo, mientras que en un sistema continuo es proporcionado medio fresco al sistema -manteniendo la concentración constante- de manera continuada (McNeil y Harvey, 1990).

Otro criterio utilizado para clasificar las fermentaciones considera la situación de las células en el cultivo. Así entonces se distinguen a) cultivos de células libres y b) cultivo de células inmovilizadas. Un criterio más lo constituye el considerar las características del fermentador, teniéndose entonces fermentaciones con agitación continua, de tipo air lift, etc. (Quintero, 1981; Prave, et al., 1987).

El último criterio que se señalará aquí es aquel que toma en cuenta el estado físico del medio de cultivo, reconociéndose los tipos a) cultivo en medio líquido y b) cultivo en medio sólido.

Es importante considerar detenidamente aquellos sustratos que puedan emplearse como componentes de los medios de cultivo adecuados para el crecimiento de los microorganismos o la producción de metabolitos microbianos de interés. Como ya se señaló, los nutrientes proporcionados a un microorganismo le permiten realizar la síntesis de componentes celulares y producir la energía que requiere para sus procesos bioquímicos. Así, los principales componentes del medio son convertidos por complejas reacciones bioquímicas en intermediarios y productos finales. Bioquímicamente hablando, los sustratos pueden clasificarse en i) simples, los cuales contienen una mínima cantidad de energía química, como por ejemplo: H_2O , CO_2 , O_2 , N_2 e iones inorgánicos; ii) de alta energía y iii) sustratos intermediarios, los cuales son formados durante la transformación de sustratos simples en otros de alta energía. Sin embargo, la distinción entre un sustrato de alta energía y uno intermediario no siempre es clara.

3.2. Formulación de medios de cultivo.

La formulación de medios de cultivo para procesos biotecnológicos es una área en la cual aún debe investigarse mucho por varias razones: a) los sustratos usados a nivel de laboratorio muchas veces no pueden utilizarse a niveles de producción debido principalmente a razones económicas. Se ha demostrado que en algunas fermentaciones importantes el costo de los materiales usados como fuentes de carbono y nitrógeno impactan sensiblemente los costos de operación del proceso (Rudd y Watson, 1968; Dale y Linden, 1984). El costo de los materiales básicos juegan un papel crucial en todo proceso industrial. Estos

costos tienen que ser compensados por una alta capacidad de producción y por la calidad del producto. En el caso de la producción a partir de materiales de desecho (muy usados en biotecnología aquellos provenientes de la agroindustria) el factor limitante no es el precio sino la calidad y cantidad en que se encuentran disponibles dichos materiales. Otros factores que deben considerarse al elegir un material de desecho son: si se requiere o no procesarlos antes de su empleo, su disponibilidad en cantidades suficientes y de calidad estable, los requerimientos de agua y energía durante el proceso de producción, contar con maquinaria y equipo adecuados, la calidad del producto final y, además, la posibilidad de utilizar dicho material en otros procesos (Sikytá, 1983).

b) Los medios complejos naturales difieren de los sintéticos en que se preparan a partir de materiales de desecho de origen animal o vegetal; la composición química exacta de estos materiales es usualmente desconocida y los componentes individuales son determinados con mucha dificultad.

c) Con objeto de hacer más rentables los procesos biotecnológicos industriales, se requiere la constante investigación para encontrar sustratos más baratos o que permitan incrementar la producción. Esto, sin descartar los esfuerzos que se hacen aislando nuevos microorganismos o mejorándolos por medio de la Ingeniería Genética. Al respecto, Murray (1985) ha hecho una completa revisión acerca de las aplicaciones más sobresalientes de la Ingeniería Genética en procesos biotecnológicos industriales.

Por otra parte, de los más de 100 elementos que aparecen en

la Tabla Periódica, sólo alrededor de 35-40 han demostrado ser nutrientes esenciales. Si bien la mayoría de estos son metales, seis no metales (Carbono, Oxígeno, Nitrógeno, Hidrógeno, Fósforo y Azufre) y dos metales (K y Mg) comprenden en promedio el 98 % del peso seco de bacterias y hongos. Usualmente estos elementos se denominan macronutrientes (se requieren en medios de crecimiento a concentraciones mayores a 10^{-4} mol/l). Todos los otros nutrientes elementales se denominan micronutrientes o elementos traza y son usualmente requeridos a concentraciones menores de 10^{-4} mol/l. Revisiones sobre el papel del carbono y nutrición en general de hongos han sido hechos por Lily (1965) y Perlman (1965), de bacterias por Pirt (1975), de levaduras por Suomalainen y Oura (1971) y del uso de nutrientes inorgánicos por Hutner (1972); Pyne, 1980; Atkinson y Mavituna, 1983. A continuación en la Tabla I se muestran las principales fuentes de carbono y nitrógeno usadas en fermentaciones.

Tabla I. Fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas en Tecnología de Fermentaciones (Demain, 1972).

Fuentes de Carbono	Fuentes de Nitrógeno
Almidones (de maíz y papa)	Harina de soya
Melazas (de caña y remolacha)	Extracto de levadura Extractos solubles de destilados
n-alcanos	Extractos de semillas de algodón
gasolinas	Sangre seca
Licores de desecho ricos en sulfuros	Licores de cocimiento de maíz
Desechos ricos en celulosa	Harina e hidrolizados de pescado

Micronutrientes.

La consideración de los micronutrientes (más comunmente denominados elementos traza) resulta hasta la fecha una de las áreas más inciertas de la nutrición microbiana. Es relativamente fácil demostrar el requerimiento de un macronutriente pero nada sencillo demostrar que un nutriente puede satisfacer un requerimiento para el crecimiento a una concentración menor a 10^{-9} molar. En la Tabla II se muestra una clasificación de los elementos traza que son requeridos por hongos y bacterias.

Tabla II. Los elementos traza requeridos por hongos y bacterias.

1. Elementos traza requeridos por todos los hongos y bacterias:
Magnesio, Zinc y Hierro.
2. Elementos traza requeridos por muchas bacterias y hongos bajo condiciones específicas de crecimiento:
Cobre, Cobalto, Molibdato y Calcio.
3. Elementos traza requeridos por algunas bacterias y hongos bajo condiciones específicas de crecimiento:
Sodio, Cloro, Niquel y Selenio.
4. Elementos traza que son muy pocas veces requeridos (o reconocidos como tales):
Boro, Aluminio, Silicio, Cromo, Arsénico, Vanadio, Estaño, Berilio, Fluor, Escadmio, Titanio, Galio, Germanio, Bromo, Wolframio, Litio y Iodo.

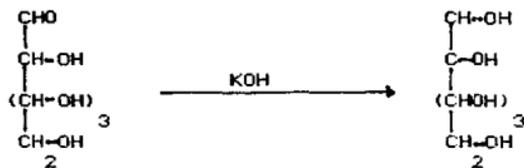
Además de los nutrientes ya citados existen otros denominados como factores de crecimiento, que incluye a vitaminas, aminoácidos y compuestos diversos. Las necesidades de ellos varían mucho según el microorganismo particular que se estudie razón por la cual no entraremos en detalle. Basta decir, a manera de corolario, que los factores de crecimiento tienen un profundo efecto en la producción de muchos metabolitos primarios y secundarios de alto impacto comercial. Para una revisión más

completa se recomienda el trabajo realizado por Weinberg (1970).

4. Métodos analíticos para cuantificar carbohidratos.

Existen reportados en la literatura un número muy grande de métodos químicos para cuantificar azúcares reductores. Sin embargo, muchos de ellos están restringidos en cuanto al tipo de muestra que se puede analizar. Esto es, no cualquier método analítico para cuantificar azúcares reductores puede utilizarse para cualquier tipo de muestra e incluso muchos de ellos sirven sólo para un tipo específico de azúcar reductor (como hexosa o pentosa). Se reconoce que la reacción más importante de los azúcares reductores es su oxidación en solución alcalina. Todos los azúcares reductores se tornan primero amarillos y luego café bajo la influencia del álcali. Se ha sugerido que esto es debido a la enolización de la molécula (March, 1988).

La reacción que se lleva cabo es la siguiente:



Esto da como resultado un doble enlace y la consecuente tautomería se dice que es la causa del color (Brown y Le May, 1988).

Los azúcares en solución alcalina sufren una deciclación a la correspondiente forma aldosa o cetosa, seguida por enolización y polimerización, rearrreglo o degradación. El curso de la reacción depende de la concentración y tipo de azúcar presente, la

concentración del álcali y la temperatura así como de las condiciones de tratamiento (Holleman y Richter, 1961).

Es un hecho interesante el que muchos de los productos de la degradación alcalina simulan aquellos producidos bajo condiciones fisiológicas mediante la acción de varias enzimas (Roehrig, 1984).

Los azúcares en soluciones neutras o ligeramente ácidas no son fácilmente oxidados en ausencia de iones como boratos (que forman complejos con los azúcares) oxígeno y por otros ciertos agentes oxidantes. En soluciones alcalinas, sin embargo, la capacidad de los azúcares para oxidarse es notablemente incrementada por una variedad de agentes oxidantes, de los cuales destacan por su importancia: soluciones alcalinas de cobre, mercurio, plata y bismuto; ferricianuro alcalino; hipioditos; oxígeno atmosférico; azul de metileno y peróxido de hidrógeno.

Los diversos métodos químicos para la cuantificación de azúcares reductores pueden clasificarse como sigue:

I. Métodos basados en la reducción de soluciones de cobre en tartrato alcalino.

A. Métodos volumétricos basados en la reducción completa de una cantidad medida de una disolución estandarizada de cobre.

1. Usando el método volumétrico de Fehling sin indicador (AOAC, 1990).
2. Usando $K_4Fe(CN)_6$ en solución y con indicador externo, método volumétrico rápido (Pigman, 1957).
3. Uso de azul de metileno en método de Lane-Eynon (Lane y Eynon, 1923; Dunsmore, Mellet y Wolf, 1980).

B. Métodos basados en la oxidación de azúcares en presencia de solución de cobre en exceso y la determinación gravimétrica o volumétrica del cobre reducido.

1. Método general de Munson y Walker (1906; AOAC, 1990).
 2. Método general de Quisumbing y Thomas (1921; AOAC, 1984).
 3. Métodos gravimétricos de Herzfeld para materiales conteniendo 1.5% o menos de azúcar invertido (Joslyn, 1950).
 4. Método gravimétrico de Allihn para dextrosa (Joslyn, 1950).
 5. Método del reactivo de Somogyi (Somogyi, 1945; AOAC, 1990).
- II. Métodos basados en la reducción de soluciones de cobre alcalino que no contienen tartrato (Aogy, et al., 1990).
- A. Reducción de cobre en solución de Benedict (Hart, 1971).
 - B. Método de Barfoed del acetato de cobre (Sultzki y Lara, 1975).
 - C. Método de Soldaini del bicarbonato de cobre (Pigman, 1957).
 - D. Método de Ost del bicarbonato de cobre (Joslyn, 1950).
 - E. Método de Kendall del salicilato alcalino (Joslyn, 1950).
- III. Métodos basados en la reducción de soluciones alcalinas de mercurio u otras soluciones de sales metálicas.
- A. Método de Knapp del cianuro alcalino de mercurio (Pigman, 1957).
 - B. Método de Schesse del ioduro alcalino de mercurio (Joslyn, 1950).
 - C. Método del bromuro alcalino de mercurio (Shalaby, et al., 1989).
- IV. Métodos basados en la reducción de soluciones alcalinas de ferricianuro.
- A. Determinación iodométrica del exceso de cianuro férrico (Hart, 1971).
 - B. Determinación cerimétrica de ferricianuro (Pigman, 1957).
- V. Métodos basados en la producción de color como resultado de la reducción.

- A. Reducción de soluciones de picrato alcalino por azúcares, para formar picratos café-rojizos (Loeuss y Tanner, 1982).
 - B. Reducción del dinitrosalicilato (Miller, 1959).
 - C. Reducción del alfa-naftol (Joslyn, 1950).
 - D. Reducción del 2,4-dinitrofenolato en solución alcalina (AOAC, 1990).
 - E. Reducción de fenol (Thomas y Duchter, 1924).
- VI. Métodos basados en la reducción de hipioditos (Willstatter y Schudel, 1918; Pigman , 1957).
- VII. Métodos basados en la reducción del ácido selenioso (Joslyn,1950).
- VIII. Métodos basados en la reducción de peróxido de hidrógeno alcalino (Isbell y Czubarow, 1990).

5. Método de Optimización de Box-Wilson.

El método de Box-Wilson es una herramienta matemático-estadística muy empleada en optimización y consiste en el desarrollo de experimentos factoriales. Un experimento factorial completo es un conjunto de observaciones que comprende todas las combinaciones posibles de los niveles de las variables o factores (Box y Wilson, 1951; Himmelblau, 1984).

Para fines prácticos, el mayor número de parámetros que pueden variarse es de 4 o 5, cada uno a dos diferentes niveles. De esta manera, un experimento en el cual se consideren tres factores, deberá contemplar entonces $2^3 = 8$ experimentos, todos ellos con condiciones diferentes entre sí.

Una condición necesaria para elegir los niveles superiores (+) e inferiores (-) de los factores, es tener en mente el concepto de región experimental o centro experimental. Y posterior a la experimentación es el ajuste de los resultados a un modelo lineal. Para esto se utiliza la ecuación de regresión correspondiente, lo cual hace posible determinar los valores de los efectos de los factores tanto separadamente como durante su interacción con otras variables.

En este último paso del procedimiento es muy utilizado el llamado análisis residual, mediante el cual es posible conocer las deficiencias del método y su ulterior mejora. Esto es, si los residuos (todo aquello no considerado en la regresión) son de valor cero, el modelo matemático propuesto es acorde con la realidad física. Así pues, este método permite encontrar los niveles óptimos de variación de los factores considerados.

El método de Box-Wilson es muy importante en la optimización de procesos porque presenta las siguientes ventajas:

i) A pesar de ser un modelo lineal, puede llegar a ajustarse para revelar el modelo real.

ii) Es relativamente rápido y preciso.

iii) Es fácil de emplear en investigaciones de laboratorio pues permite el manejo de numerosas variables y de manera simultánea.

iv) Como resultado de su aplicación, siempre se obtiene una mejora en el proceso.

v) Consiste en un algoritmo sistemático, lo cual es de gran valor en una situación compleja.

vi) Realmente tampoco se ha demostrado otra alternativa válida.

Sin embargo, deben asimismo considerarse una serie de desventajas que implica su uso:

i) Tiene todas las desventajas de un modelo factorial.

ii) Si son elegidas variables inadecuadas se corre el riesgo de trabajar en otras regiones experimentales.

iii) Son determinantes la intuición y experiencia del investigador al manejarlo.

6. Conceptos y Definiciones en Validación.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo. Es decir, el método debe probarse para determinar su aplicabilidad en los sistemas de nuestro interés. La validación general incluye una evaluación de la precisión, linealidad y exactitud y proporciona una medida del comportamiento del método (Lepore, 1979; Guerra, 1986).

La validación de un método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, mediante estudios de laboratorio, que el método es capaz de satisfacer los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. De aquí entonces puede fácilmente comprenderse la importancia que reviste. En México la validación es un requisito que se desprende de la Ley General de Salud y de las Buenas Prácticas de Manufactura y Laboratorio vigentes (Secretaría de Salud, 1984; Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas-Asociación Farmacéutica Mexicana, 1983; CIPAM, 1989).

En la validación se emplea el análisis estadístico y el éxito de la aplicación que los métodos estadísticos tienen muchas veces no es considerado con la profundidad que debiera. Esto es, el uso del análisis estadístico está limitado a ciertos fenómenos. El gran matemático francés Henry Poincaré lo ha planteado de manera magistral: " Los principios de las matemáticas son convencionales pero no arbitrarios: su método, como el de todas las ciencias, se basa en la inducción que hace que esperemos la repetición de un fenómeno cuando se reproducen las circunstancias en que por primera vez se presentó: no es en sentido alguno aplicable a

sucesos individuales no reproducibles. Los fenómenos que sólo se han probado una vez y no están destinados a renovarse, nada nos enseñan. Cuando en un fenómeno reproducible no nos es posible abarcar todo lo que acontece, es preciso seleccionar algunos de los hechos. El fenómeno no acontecerá entonces de manera idéntica cada vez que se le intente reproducir, sino que será necesario aplicar una inducción derivada de las múltiples realizaciones anteriores de dicho fenómeno. Este proceso nos dirá entonces con qué grado de certeza los hechos seleccionados acontecerán de manera idéntica al patrón definido por el comportamiento repetido que se ha observado en las múltiples realizaciones previas' (Poincaré, 1952).

Así entonces, el proceso al que se hace mención lo denominaremos aquí como validación. Y para validar un método analítico deben evaluarse varios parámetros, los cuales son definidos a continuación :

1) Especificidad: Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al compuesto de interés y no a otros presentes en la muestra analizada.

2) Linealidad: Es la capacidad del método para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden obtenerse directamente o por una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración del compuesto de interés dentro de un intervalo determinado.

3) Límite de Cuantificación: Es la más baja concentración del

compuesto de interés presente, determinada con precisión y exactitud bajo condiciones de operación establecidas.

4) Exactitud: Es el grado de concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y uno de referencia arbitrariamente fijado de antemano.

5) Precisión, la cual se divide en dos aspectos:

a) Repetibilidad: Se expresa como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un sólo analista usando los mismos aparatos y técnicas.

b) Reproducibilidad: Se expresa como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

2. Aplicación de la Validación en Biotecnología.

En base a charlas formales e informales con reconocidos biotecnólogos y a una revisión personal en tesis para la obtención de grados Maestría y Doctorado resultó que la Validación en general era poco menos que desconocida por ellos. Lo anterior no resulta sorprendente puesto que la gran mayoría de ellos provienen de carreras como Biología o bien Ingeniería Química o Bioquímica. Dado que una de las obligaciones del CFB (y de cualquier profesional) es detectar y resolver o contribuir a la solución de los problemas, fue iniciada una labor tendiente a concientizar a los investigadores de la importancia que la Validación tiene. Y una revisión más profunda de los trabajos desarrollados demostró que en muchos métodos analíticos empleados

en Biotecnología existen diversas fuentes de error que apenas y han sido consideradas por lo que, en el caso de la determinación de azúcares reductores con reactivo DNS, se han encontrado comportamientos extraños que son atribuidos a muy diversas causas pero nunca al método analítico per se. Con base en estos antecedentes se realizaron estudios preliminares para establecer las condiciones bajo las cuales se logran las cuantificaciones de reductores más cercanas a lo que realmente ocurre en una fermentación. Finalmente, la aceptación de la importancia que tiene la corroboración de que un método analítico en particular puede satisfacer las aplicaciones deseadas, no ha sido fácil cuando los intentos son hechos en el campo biotecnológico, al grado de negarse la presentación de trabajos en Congresos Nacionales por considerarlos totalmente ajenos a esta disciplina.

CAPITULO SEGUNDO
METODOLOGIA

...Cuando un fulgor de pájaro amarillo
enterró las corrientes del azufre
al pie de las glaciales cordilleras.
El vanadio se vestía de lluvia
para entrar a la cámara del oro.
afilaba cuchillos el tungsteno
y el bismuto trenzaba
medicinales cabelleras...

(La lámpara en la Tierra;

Pablo Neruda (1904-1973)

Había una vez un mandril inteligente.
que solí tocar el fagot.
puesto que decía:
"Me parece que dentro de billones de años,
lograré, ciertamente, dar con el tono".

Sir Arthur Stanley Eddington
(1882-1910)

METODOLOGIA

Primero es realizada una extensa revisión bibliográfica en la literatura científica sobre métodos analíticos para determinar azúcares reductores. De entre todos los métodos encontrados son seleccionados aquellos que teóricamente pudieran ser aplicables a la determinación de carbohidratos reductores en diversos medios de fermentación y que al mismo tiempo cumplan con una serie de requisitos: la disponibilidad de los reactivos en el laboratorio, el riesgo potencial a la salud asociado con su uso, la estabilidad química y física de estos, que el método resulte específico, sencillo y permita el manejo de muchas muestras a la vez.

Inmediatamente después son evaluados experimentalmente los métodos analíticos que cumplen con los anteriores requisitos. Para este fin cada uno de ellos es ensayado en ocho medios de fermentaciones cuya composición promedio es ampliamente utilizada en un gran número de procesos biotecnológicos. Los medios de fermentación empleados se listan en la Tabla III y los métodos evaluados experimentalmente se ensayaron además en soluciones acuosas de cada uno de los componentes aquí mostrados.

Todos y cada uno de los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y de manera independiente.

TABLA III. MEDIOS DE CULTIVO EVALUADOS (COMPOSICION EN % P/V)

	A	B	C	D	E	F	G	H
Extracto de levadura	0.5	0.5	-	-	0.5	0.5	-	0.5
Extracto de malta	-	-	0.5	0.5	-	0.5	-	-
Agua de cocimiento de maiz	-	0.5	-	-	-	-	0.5	-
Extracto de carne	0.5	-	0.5	-	-	-	-	-
Peptona de caseina	-	-	-	1.0	1.0	-	-	1.0
NH ₄ H ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	-	0.5	-	0.5	0.25	-	-
KH ₂ PO ₄	-	0.10	-	0.10	-	0.10	0.10	-
MgSO ₄	0.01	-	0.01	-	0.01	-	-	-
KCl	0.01	-	0.01	0.01	-	-	0.01	-
NaCl	-	0.10	-	-	0.1	-	-	1.0
FeSO ₄	0.01	-	-	-	-	-	0.01	-

La aplicabilidad del método en particular se obtiene evaluando su especificidad para determinar los azúcares reductores en presencia de los otros componentes del medio y una estimación cuantitativa de ella es lograda utilizando un parámetro aquí definido como "coeficiente de interferencia". Las soluciones acuosas de cada uno de los componentes se emplearon con objeto de determinar, en caso de presentarse, cual es la fuente de interferencia que hacen al método aquí aplicado inespecífico.

Luego de lo anterior y en caso de ser necesario, el método es "afinado" evaluando algunos factores que son determinantes en su comportamiento como: temperaturas y tiempos de reacción, preparación y composición de los reactivos utilizados y estabilidades de los colores desarrollados. Para conocer si dichos estudios deben ser realizados, se utiliza un nuevo concepto: el de "porcentaje de recobro". Esto es, a cada uno de los ocho medios de fermentaciones se adicionan cantidades conocidas de azúcares reductores (glucosa) y se coteja contra la cantidad encontrada experimentalmente (recuperada) al aplicar el método en cuestión. Los porcentajes de recobro menores al 90% se consideran inadecuados y exigen la "afinación" del método.

Una vez establecidas una serie de condiciones estándar para el método analítico elegido, se procede a optimizarlo. Por esta razón se emplea la conocida metodología descrita por Box y Wilson. Mediante esta herramienta se mejora el método y aquí en particular es aplicado para establecer la cantidad de reactivo y los tiempos de reacción más adecuados.

Posteriormente el método es sometido a estudios pre-validatorios siguiendo las recomendaciones hechas por comités oficiales de validación y en base a las prácticas adecuadas de laboratorio y manufactura. Se evaluaron los parámetros: linealidad, límite de cuantificación, exactitud, reproducibilidad y repetibilidad. En la evaluación de la linealidad y la exactitud del método se utiliza como estadígrafo de contraste la distribución t de Student. Para el límite de cuantificación se determinó experimentalmente la mínima cantidad de glucosa cuantificada con exactitud y precisión. Para la reproducibilidad

se utilizó como estadígrafo de contraste la distribución F de Fisher, practicándose el análisis de varianza. La repetibilidad fue evaluada mediante el coeficiente de variación.

Finalmente, el método elegido es ensayado en medios de fermentación empleados en dos procesos biotecnológicos: la producción de ácido cítrico por el hongo filamentoso *Aspergillus niger* y la producción de la enzima penicilino-amidasa utilizando una cepa de la eubacteria *Escherichia coli* modificada por ingeniería genética. En ambos ensayos se cuantifica el consumo del azúcar reductor glucosa, utilizada aquí como fuente de carbono, conforme es asimilada por los microorganismos durante todo el proceso fermentativo.

METODOLOGIA

Respecto a los métodos analíticos aquí evaluados, estos son descritos a continuación incluyendo también los fundamentos, el material y el equipo requeridos.

A. Método de la determinación con ácido sulfúrico-fenol.

Fundamento: Se basa en la oxidación de los azúcares reductores por el ácido sulfúrico y la formación de un compuesto colorido por acción del fenol. Este compuesto colorido absorbe luz a una longitud de onda entre 480-490 nanómetros (Dubois, et al., 1951; 1956).

Material y equipo: Pipetas graduadas de 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 ml; pipetas automáticas de 10, 100 y 1000 microlitros; matraces volumétricos de 10, 25, 50 y 100 ml; baño de agua con termostato; espectrofotómetro o colorímetro (lecturas a 490 nm). Se utilizó un aparato Beckman modelo S-35.

Solución de fenol al 80% (cristales obtenidos de Baker, Chem. Co., grado reactivo analítico); ácido sulfúrico de 95.5% de pureza según especificaciones de la American Chemical Society (ACS), de gravedad específica 1.84 (obtenido de Merk, Co., grado reactivo analítico); glucosa (Merk, Co., grado químicamente puro).

B. Determinación con 2-bifenilamina.

Fundamento: Según Timell y colaboradores, la amina aromática que

da mejores resultados, entre la 1- y 2- naftilamina y la orto-, meta- y para-fenilendiamina fue la orto-aminodifenilo, un compuesto que si bien no está disponible comercialmente en alto grado de pureza, puede prepararse fácilmente a partir del producto de grado técnico. Esta amina aromática, cuando se calienta en ácido acético glacial y ha sido adicionada a una solución del azúcar reductor, se condensa con el azúcar resultando en la formación de un color característico para cada clase de azúcar.

En el caso de la glucosa la reacción resulta en un compuesto de color verde que absorbe luz a 380 nanómetros (Timell, et al., 1956).

Material y equipo: Matraces volumétricos de 10.0, 25.0, 50.0 y 100.0 ml; pipetas graduadas de 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 ml; micropipetas de 20.0, 200.0 y 1000.0 microlitros; bureta de 50 ml; baño de agua con termostato integrado; tubos de ensayo de 30 x100 con tapones de baquelita y con rosca; espectrofotómetro para lecturas a 380 nm (se utilizó aquí un aparato Beckman modelo S-35); desecador conteniendo pentóxido de fósforo.

Cristales de orto-aminodifenilo (Sigma Chem. Co, grado técnico); etanol absoluto (Merck, Co.); carbón activado (Durango Vela); ácido acético glacial (Baker, Chem. Co., grado reactivo analítico); glucosa en polvo (grado industrial); ramnosa cristalina (Merck, Co., grado reactivo analítico); pentóxido de fósforo (Merck, Co., grado técnico).

C. Determinación mediante el método del ferricianuro.

Fundamento: Este método se basa en la reducción de una solución alcalina de ferrocianuro por parte de los azúcares reductores e involucra la formación de un compuesto colorido por acción de los iones del metal reducido sobre el arsenomolibdato. Este compuesto colorido absorbe luz a una longitud de onda de 515 nm. (Tins, 1956).

Material y equipo: Matraces volumétricos de 100, 250 y 1000 ml; pipetas volumétricas de 1.0, 5.0 y 10.0 ml; pipetas graduadas de 5.0 ml; incubadora con termostato integrado y agitación constante; bureta de 25 ml; espectrofotómetro o colorímetro para lecturas a 515 nanómetros (aquí se empleó un colorímetro Bausch & Lomb modelo Spectronic 20).

Solución alcalina de ferrocianuro (se utilizó ferrocianuro de potasio en cristales, Merck, Co., grado reactivo analítico); Solución de arsenomolibdato (se utilizó molibdato de amonio tetrahidratado obtenido de Baker, Chem. Co., grado reactivo analítico); carbonato disódico anhidro (Merck, Co., grado patrón primario); fosfato disódico heptahidratado (Baker, Chem. Co., grado reactivo analítico); arseniato disódico (Baker, Chem. Co., grado reactivo analítico); ácido sulfúrico concentrado de pureza 95.5% según especificaciones de la ACS, de gravedad específica 1.84 (obtenida de Merck, Co.); hidróxido de sodio (Merck, Co., grado químicamente puro); ácido clorhídrico concentrado de 37% pureza (Baker, Chem. Co., grado analítico); glucosa grado industrial.

D. Determinación con el reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Fundamento: El reactivo con ácido 3,5-dinitrosalicílico, desarrollado a principios de siglo (Sumner, 1921; 1925; Sumner y Lislér, 1944) para la determinación de azúcares reductores está formado por los siguientes compuestos: ácido 3,5-dinitrosalicílico, sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio), fenol, bisulfito de sodio e hidróxido de sodio. De acuerdo con los autores, el tartrato es adicionado para prevenir la acción del oxígeno disuelto sobre el reactivo; el fenol se usa para incrementar la cantidad de color producido y el bisulfito con objeto de estabilizar el color obtenido en presencia del fenol. El álcali se requiere para la acción reductora del carbohidrato sobre el ácido dinitrosalicílico.

La química de la reacción se ha esclarecido sólo parcialmente. El DNS es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico y, por la vía más simple, el grupo aldehído parece oxidarse a grupo carbonilo. Sin embargo, no se ha esclarecido totalmente la relación estequiométrica entre el ácido aminonitrosalicílico y los azúcares (Hostettler, Borel y Deuel, 1951) y los diferentes azúcares dan diferentes intensidades de color, lo cual sugiere que la química de la reacción puede ser apreciablemente más compleja (Bell, Manners y Palmer, 1952; Meyer, van der Wyk y Deng, 1954).

Material y equipo: Matraces volumétricos de 50, 100, y 500 ml; pipetas volumétricas de 0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 ml; tubos de ensayo de 13 x100 mm; baño de agua con termostato integrado; aparato dosificador de agua; pipetas automáticas de 500 microlitros; espectrofotómetro o colorímetro para lecturas entre 500-530 nanómetros.

Acido 3,5-dinitrosalicílico en polvo (Aldrich Co., 98% de pureza); hidróxido de sodio en lentejas (Merck Co., químicamente pura); tartrato de sodio y potasio (Sal de Rochelle); fenol; metabisulfito de sodio (todos obtenidos de Baker Chem. Co., grado reactivo analítico).

Los cuatro métodos experimentalmente ensayados son descritos en los diagramas de flujo mostrados a continuación:

Efectuar diluciones de la muestra hasta obtener una concentración aproximada de hasta 60 microgramos/mililitro. De la alícuota tomada, verter 2 ml en una celda espectrofotométrica.

Agregar 0.85 ml de fenol al 80 % e inmediatamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Agitar vigorosamente pero con cuidado y dejar reposar por 10 minutos.

Luego de transcurridos los 10 minutos, colocar las muestras en un baño de agua mantenido a 20-30°C. durante 10 a 20 minutos. Luego leer las muestras a 490nm. Realizar un blanco de reacción con agua destilada y construir la curva de calibración con glucosa.

Transferir con pipeta volumétrica 1 ml de la muestra, la cual contiene entre 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$ de azúcares reductores, a tubos de ensayo de 13X100 con cuello de rosca. Tapar bien los tubos utilizando tapones de baquelita.

Adicionar con bureta 5 ml del compuesto orto-aminobifenilo preparado al 5% en ácido acético glacial. Colocar ahora los tubos, abiertos, en un baño de agua.

Mantener los tubos en ebullición por 1 minuto y después taparlos herméticamente con los tapones de baquelita. Ebullicir por otros 60 minutos. Luego enfriarlos a chorro de agua y leer a 380 nm. Construir la curva de calibración respectiva con glucosa y un blanco con agua destilada.

Preparación del reactivo: Disolver 160 g de carbonato sódico anhidro y 150 g de fosfato disódico heptahidratado en 850 ml de agua destilada. Adicionar 4 g de ferrocianuro de potasio y aforar a 1 L.

Preparar la solución de arsenomolibdato como sigue: Disolver 25 g de molibdato de amonio tetrahidratado en 450 ml de agua destilada. Adicionar 21 ml de ácido sulfúrico concentrado y 3 g de arsenito de sodio en 25 ml de agua destilada. Calentar a 55°C por 30 minutos con una agitación constante.

Preparar una solución 2 M de ácido sulfúrico. Diluir la muestra con agua de tal manera que la concentración final de azúcares reductores no sea mayor de 1500 µg por mililitro.

Agitar vigorosamente los matraces hasta que cese el desprendimiento de gases. Agregar 4 ml del reactivo con molibdato. Agitar bien y aforar. Leer a 515 nm. Correr blancos de agua y construir la curva de calibración usando una solución de glucosa de concentración conocida y siguiendo el mismo tratamiento que para la solución problema.

Tomar 1 ml de la muestra diluida y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml. Agregar 5 ml del reactivo de ferrocianuro y colocar el matraz en un baño de agua a ebullición por 10 minutos. Enfriar rápido al chorro de agua y neutralizar con 10 ml de ácido sulfúrico 2 N.

Preparación del reactivo: Disolver, por cada 100 ml y en el orden que se mencionan, 1.4 g de hidróxido sódico, 0.75 g de ácido 3,5-DNS, 21.6 g de la sal de Rochelle, 0.54 g de fenol y 0.59 g de metabisulfito sódico.

A una muestra de un mililitro que contiene azúcares reductores, se le adiciona un ml del reactivo. Luego se ebullen las muestras en un baño de agua por cinco minutos.

Enfriar los tubos rápidamente al chorro de agua fría. Dejar reposar por diez minutos y luego adicionar 10 mililitros de agua destilada. Agitar las muestras vigorosamente en un vórtex y luego leer en un espectrofotómetro a 558 nm.

Correr blancos de reacción utilizando agua destilada y realizar una curva de calibración empleando glucosa en solución a concentración conocida.

Por último, se describen a continuación los procedimientos seguidos al ensayar el método analítico elegido en medios de fermentación utilizados para el cultivo de hongos filamentosos y bacterias recombinantes.

Para la fermentación de hongos filamentosos productores de ácido cítrico, se utilizaron como modelo una cepa de *Aspergillus niger* ATCC 20107 y algunos otros hongos filamentosos aislados de diversas fuentes, todos ellos productores de ácido cítrico. Para el aislamiento de estos hongos se siguió un procedimiento similar al reportado por Bolaños, Mota, et al. (1991) y por Bolaños y Rey (1992). La realización de microcultivos y algunas pruebas bioquímicas demostraron que los hongos filamentosos aislados pertenecen también al género *Aspergillus*. Los medios de cultivo empleados se listan a continuación (composición en porcentaje p/v):

Medio de Martin

Glucosa 1.0 g
 Peptona 0.5 g
 KH₂PO₄ 0.1 g
 MgSO₄ 0.05 g
 Rosa de Bengala 0.001 g
 Estreptomicina 3 µg/ml
 Agua destilada 100 ml
 pH final = 6.00

Medio de Foster

Glucosa 5.0 g
 Peptona 0.5 g
 KH₂PO₄ 0.1 g
 MgSO₄ 0.05 g
 Agar 2.0 g
 Indicador* = 6.7 ml
 Agua destilada 100ml
 pH final = 3.00

*Solución indicadora: Se prepara disolviendo 1.0 g de verde de bromocresol en 14 ml de hidróxido de sodio 1.0 N y aforando luego

a 250 ml con agua destilada.

Medio semilla

Maiz molido 25 g

25 ml de la solución

siguiente:

KH₂PO₄ 0.5 g

2 4

MgSO₄ 0.05 g

4

(NH₄)₂SO₄ 1.0 g

4 2 4

pH final = 3.0-4.0

Medio de producción

Glucosa 10 g

KH₂PO₄ 0.25 g

2 4

MgSO₄ 0.025 g

4

NH₄NO₃ 0.25 g

4 3

Agua destilada 100 ml

Procedimiento:

De las colonias aisladas se hicieron diluciones seriadas hasta concentraciones de 10^{-5} . Posteriormente, de la última dilución se plaquearon 0.2-0.5 ml en cajas Petri que contuvieron medio de Martin y se incubaron éstas por 24 hrs a 29°C.

Se hizo lo mismo en cajas conteniendo medio de Foster. Después de incubar se seleccionaron aquellas colonias que mostraron un halo amarillo a su alrededor: esto indica que se trata de microorganismos productores de ácido. Una vez seleccionadas las cepas del medio Foster, se sembraron en tubos conteniendo agar inclinado de papa-dextrosa (PDA) con objeto de favorecer la esporulación de los microorganismos e incubando por tres a cuatro días a 29°C. Una vez esporulados, se retiraron del tubo por suspensión en 10 ml de solución salina estéril al 0.85%. Este volumen se adicionó al matraz que contuvo el medio semilla. Una vez alcanzada la esporulación de los hongos en el medio semilla, se recuperaron por nueva suspensión con 30-40 ml de solución salina estéril al 0.85% y se transfirieron estas esporas al medio

de producción, incubando con agitación constante de 200 rpm a 29° C. Las muestras se tomaron a los 2, 4, 6, 8 y 10 días de iniciada la fermentación. El micelio fue retirado por centrifugación (3000 rpm por 5 minutos) y la fermentación detenida al alcanzarse una acidez constante en el medio y consumirse más del 95% de los azúcares reductores adicionados.

La cantidad de ácido cítrico producido se determinó mediante el método colorimétrico de Saffran-Dermstedt. Este método es descrito detalladamente en el apéndice A9.

Para la fermentación de bacterias recombinantes se utilizó como modelo una cepa de *Escherichia coli* que contiene un plásmido portador del gen para la expresión de la enzima penicilino-amidasa (*E. coli* PMG 10).

El medio de cultivo empleado fue el LB (Caldo de Luria) cuya composición, en porcentaje peso/volumen fue la siguiente:

Peptona de caseína	1.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
Cloruro de sodio	1.0 g
Glucosa	2.0 g
Cloranfenicol	20 mg/ml
Agua destilada	100 ml
pH final	7.10

.. El procedimiento empleado es el siguiente:

Una colonia proveniente de un cultivo en caja de Petri, que contuvo medio LB más 2% de agar base, se resuspendió en 5.0 ml de medio LB estéril. Luego se incubó por 6 hrs a 29°C y con una

agitación rotatoria de 200 rpm.

Posteriormente se inoculó un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml de medio LB estéril. La incubación fue realizada de manera idéntica a la antes descrita.

Con 50 ml del cultivo anterior se inocularon dos matraces Fernbach de 2,800 ml, conteniendo cada uno 500 ml de medio LB estéril. se incubó por 12 hrs a 29°C con agitación rotatoria de 200 rpm.

Con el contenido de los dos matraces Fernbach anteriores se inoculó un fermentador de 14 litros, el cual contuvo 10 litros de medio LB estéril. Fue utilizada aquí un jarra de 14 litros de cristal refractario con cabezal New Brunswick Sci. Co. Modelo F-14-1002: una bomba peristáltica Masterflex Modelo 7013 adaptada a un controlador automático de pH y una consola New Brunswick Scientific Co. Modelo M-19-1410.

Se realizó la fermentación a 29°C, 1 vvm de aereación y 400 rpm. El pH fue ajustado durante toda la fermentación entre 6.80-7.20 con hidróxido de potasio 3N.

El monitoreo se realizó cada dos horas, evaluando los parámetros: crecimiento microbiano, pH, consumo de azúcares reductores (utilizados aquí como fuente de carbono), oxígeno disuelto, proteína total y actividad enzimática de penicilino-amidasa. La fermentación se realizó por 8.0-10 hrs, recuperando el paquete celular y conservándolo por congelación.

La enzima penicilino-amidasa no se excreta al medio de cultivo (es intracelular) por lo que debe extraerse de la célula. La técnica aquí empleada para lograr lo anterior fue el

choque osmótico y la técnica en detalle se describe en el apéndice A10.

Una vez extraída la enzima se procedió a evaluar su actividad, para lo cual se siguió el método del para-dimetilaminobenzaldehído. La técnica detallada de esta microdeterminación se muestra en el apéndice A11.

La determinación de la concentración proteica se hizo empleando el método de Bradford y la concentración celular mediante turbidimetría. Estas dos técnicas se describen detalladamente en los apéndices A12 y A13, respectivamente.

La determinación del consumo de azúcares reductores es el parámetro sobre el que se hizo énfasis (por obvias razones) y se utilizó el método del DNS ya descrito en la página 46.

Finalmente, con objeto de corroborar que la cepa de *Escherichia coli* PMG 10 sigue siendo recombinante durante toda la fermentación, fue realizado el aislamiento y la purificación, a pequeña escala, del plásmido de ADN. Esta determinación es importante porque se ha reconocido la pérdida de un plásmido portador del gen insertado como uno de los principales problemas en fermentaciones de bacterias recombinantes (Lewin, 1990). El procedimiento es descrito en detalle en el apéndice A14.

CAPITULO TERCERO
ELECCION DE METODOS

Minino de Chester...

?Quieres decirme, por favor,

qué camino debo elegir para salir de aquí?

Eso depende mucho de adónde quieres ir

respondió el Gato.

Poco me preocupa adónde ir -dijo Alicia.

Entonces poco importa el camino que elijas -replicó

el Gato.

Con tal que conduzca a alguna parte -añadió Alicia

como conclusión.

Oh! Puedes estar segura que llegarás a alguna parte

-dijo el Gato- si caminas lo suficiente....

Alicia en el País de las Maravillas

Lewis Carroll (1832-1898)

ELECCION DE METODOS.

De todos los métodos anteriormente descritos, se probaron experimentalmente los que ofrecieron mayores ventajas teóricas, las cuales fueron: 1) Factibilidad de ser empleados en las muestras obtenidas de medios de fermentación; 2) Ser relativamente rápidos y sencillos; 3) Permitir el manejo de muchas muestras a la vez; 4) Contar en el laboratorio con todos los reactivos, materiales, equipo e instrumentos necesarios.

Las razones que justificaron su elección fueron las siguientes:

A. Método del ácido sulfúrico-fenol. Este método aparece como uno de los mejores: es colorimétrico, por lo que posee una alta sensibilidad; es rápido, no requiere equipo sofisticado y también es muy económico al sólo requerir de ácido sulfúrico y fenol.

B. Determinación con 2-bifenilamina: Este método, a pesar de requerir un reactivo no muy común comercialmente, fue elegido por ser uno de los reportados en la literatura con mayor frecuencia e incluso recomendado en dichos trabajos. Aunque la determinación requiere de al menos 2 horas, es posible tratar muchas muestras a la vez. Una desventaja que cabe mencionar es la necesidad de utilizar mucho ácido acético glacial puro, lo que resulta costoso. No obstante, las ventajas que reporta su uso hacen de este método uno de los elegidos para intentar su aplicación a los medios de fermentaciones aquí estudiados.

C. Determinación del ferricianuro. Este método, originalmente

reportado para la cuantificación de reductores en jugos de frutos cítricos, parece ser aplicable a otros sistemas de composición química compleja, como lo son los medios de fermentaciones. Se eligió debido a que es colorimétrico, resulta rápido y se contó con todos los reactivos necesarios en nuestro laboratorio.

D. Método del reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Este método fue elegido también por ser colorimétrico, rápido y contar con los reactivos necesarios. El uso del ácido 3,5-dinitrosalicílico (también llamado DNS) ya se ha reportado para su uso en medios de fermentación. Sin embargo, los resultados obtenidos no siempre fueron consistentes con lo esperado, lo que debe considerarse al estudiarlo aquí.

SEGUNDA PARTE

CAPITULO CUARTO
RESULTADOS Y DISCUSION

1. Resultados
 - 1.1 Método A
 - 1.2. Método B
 - 1.3. Método C
 - 1.4. Método D
 - 1.5. Discusión
2. Estudio de los factores que afectan la determinación de azúcares reductores con reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico.
 - 2.2. Discusión.
3. Optimización del método del DNS.
 - 3.3. Discusión.
4. Prevalidación del método que ocupa el reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico.
 - 4.2. Discusión.
5. Aplicación del método DNS en procesos biotecnológicos.
 - 5.3. Otras aplicaciones del DNS

El cerebro no es un órgano del pensamiento,
sino un órgano de la sobrevivencia, como
las zarpas y los colmillos.
Está hecho de tal forma, que nos hace
aceptar como verdad cosas que sólo
son ventajas .

Albert Szent-Györgyi
(Al serle entregado el premio Nobel
de Fisiología y Medicina, 1937).

Y si esto no fuera precisamente la verdad?
Y si esto no estuviera demostrado?
Y si todo esto se redujera a la vanidad, al deseo de
dominación, a la impaciencia, al temor, a la locura
llena de arrobamiento o de espanto de los hombres?

(Aurora)
Frederich Nietzsche (1844-1900)

RESULTADOS

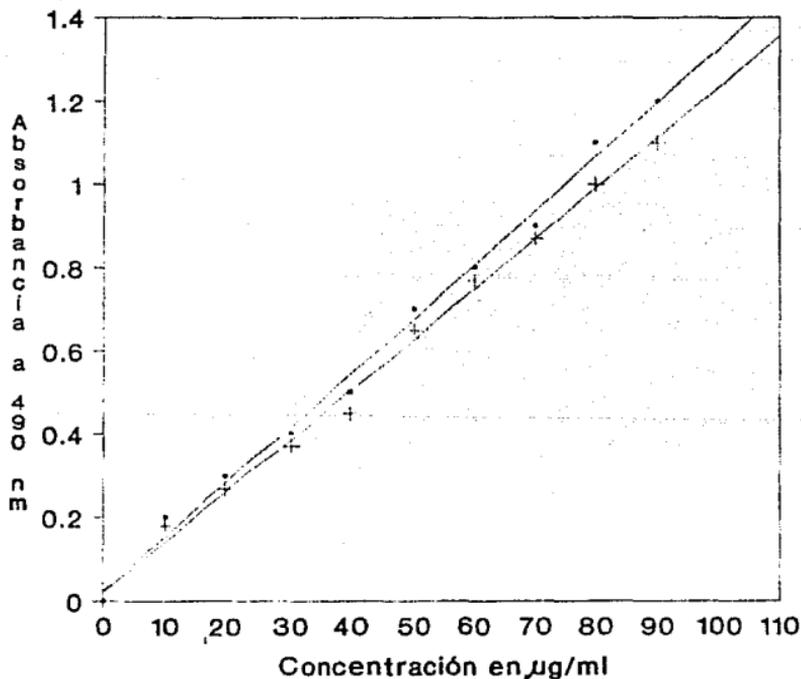
Los resultados obtenidos durante la evaluación experimental de los cuatro métodos elegidos son descritos a continuación:

Método A. Determinación con ácido sulfúrico-fenol.

Primeramente fueron construidas las curvas de calibración para soluciones acuosas y soluciones tamponadas que contienen, separadamente, glucosa y ramnosa. Esto con objeto de corroborar que el presente método presenta una tendencia lineal en el intervalo de concentraciones estudiado. Las lecturas se hicieron a dos diferentes longitudes de onda, 480 y 490 nanómetros porque ambas se reportan como útiles en la cuantificación de azúcares reductores. No se llevó a cabo un estudio de "barrido" porque está ya reportado que el máximo de absorción se tiene precisamente entre los 480-490 nanómetros. El procedimiento experimental utilizado es el mostrado enseguida.

Se realizaron los experimentos por triplicado y los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 1, para las lecturas hechas a 490 nanómetros y en la Gráfica 2 para las lecturas a 480 nm:

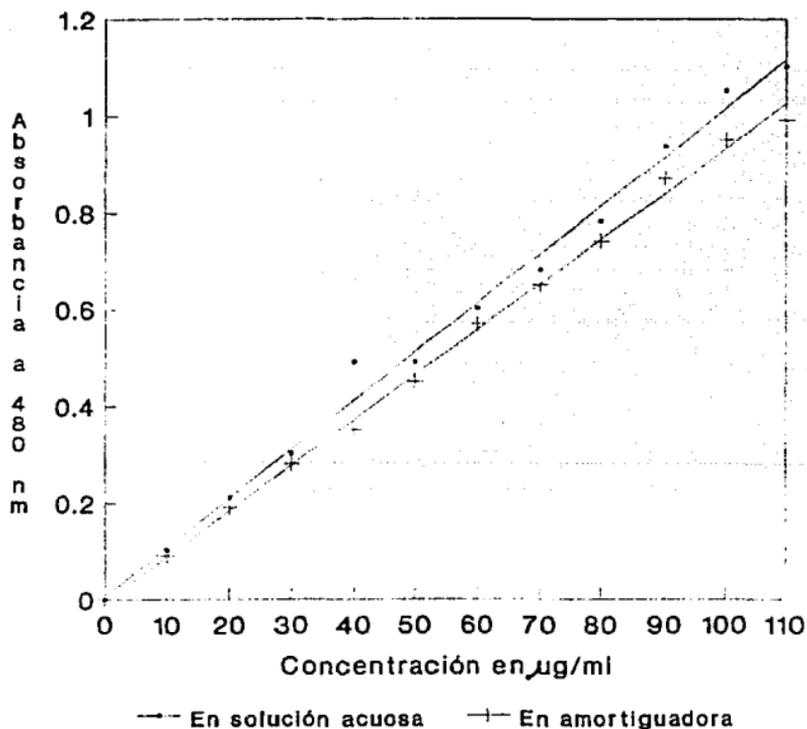
Gráfica 1
Curva de calibración para glucosa



—•— En agua destilada —+— En amortiguadora

Glucosa en agua y en solución
amortiguadora de acetatos pH. 4.0
 $r=0.9934$ y $r=0.9945$ respectivamente

Gráfica 2
Curva de calibración para ramnosa



**Ramnosa en solución acuosa y en sol.
tamponada de acetatos pH 4.0**
 $r=0.9963$ y 0.9965 respectivamente.

En ambas curvas de calibración y tanto para glucosa como para ramosa, se aprecia una muy buena linealidad a las dos longitudes de onda estudiadas, según demuestran los coeficientes de correlación encontrados (todos entre 99.39-99.65%).

Posteriormente se hizo un estudio con las soluciones de cada uno de los componentes de los medios de fermentación estudiados y aquí se encontraron interferencias muy grandes debidas a alguno o algunos de los compuestos químicos presentes en el extracto de levadura, el extracto de carne, el agua de cocimiento de maíz y el extracto de malta empleados. En el Apéndice A1 se mencionan las composiciones químicas promedio de estos sustratos.

Los resultados arriba mencionados se muestran en la Tabla IV y consisten en el valor promedio luego de tres determinaciones independientes:

Tabla IV. Estudio de la especificidad de la determinación con ácido sulfúrico-fenol para disoluciones de los componentes presentes en los medios de fermentación estudiados.

Sustrato	%Transmitancia	Coefficiente de Interferencia
Blanco de agua	99.00	1.00
Extracto de levadura	30.00	3.30
Extracto de carne	46.00	2.15
Agua de cocimiento de maíz	24.50	4.04
Extracto de malta	69.00	1.43
Peptona de caseína	91.50	1.08
NH ₄ H ₂ PO ₄	95.50	1.03

Sustrato	% Transmitancia	Coef. Interferencia
(NH) SO 4 2 4	96.00	1.03
KH PO 2 4	95.50	1.03
MgSO 4	95.50	1.03
KCl	96.00	1.03
NaCl	95.80	1.03
FeSO 4	91.80	1.08

El Coeficiente de Interferencia es definido como el cociente del porcentaje de Transmitancia del blanco de agua entre el porcentaje de Transmitancia del componente en cuestión.

Matemáticamente se expresa así:

$$\text{Coeficiente de Interferencia} = \frac{\% \text{ de Transmitancia del blanco}}{\% \text{ de Transmitancia de la muestra}} \times 100$$

El valor de referencia es 1.00 y mientras mayor sea el valor numérico de este coeficiente, mayor es el grado de interferencia del compuesto en la determinación.

La razón de expresar el coeficiente de interferencia en porcentaje de transmitancia obedece a que ésta sigue un comportamiento lineal, mientras que la absorbancia sigue un comportamiento logarítmico.

Luego de detectadas las interferencias debidas a los sustratos mencionados, está claro que el método de la determinación con ácido sulfúrico-fenol no es específico para azúcares reductores. Un posterior estudio, con objeto de demostrar su inaplicabilidad

a los sistemas de nuestro interés, se realizó de la siguiente manera: A medios de fermentación A, B, C y D se les adicionó glucosa. La concentración final de este azúcar fue de 50 g/l. Luego se ensayó el método analítico y se calculó el % de glucosa recuperado. Los resultados promedio de tres determinaciones independientes son los mostrados en la Tabla V.

Tabla V. Porcentajes de recobro logrados al utilizar el método D en diferentes medios de fermentación.

Medio de fermentación empleado	Cantidad de glucosa recuperada (g/l)	% de Recobro
A	38.000	76.00
B	29.000	58.00
C	27.000	54.00
D	28.000	56.00

El porcentaje de recobro está definido aquí como:

$$\frac{\text{Cantidad de azúcares reductores cuantificada}}{\text{Cantidad de azúcares reductores adicionada}} \times 100$$

La composición química de los medios de fermentación anteriores ya se indicó en la Tabla III.

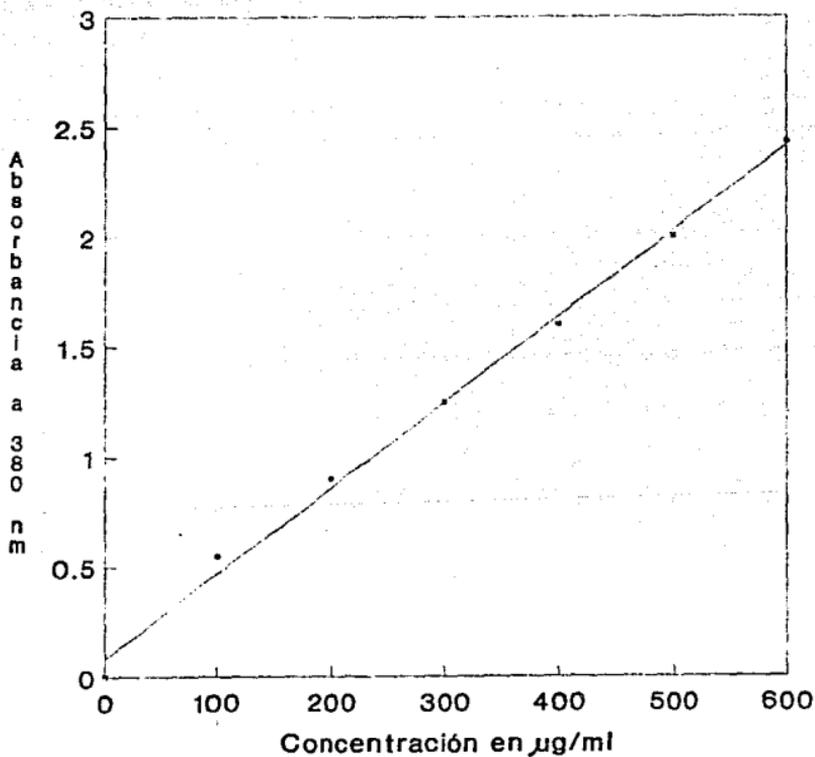
Como se aprecia en la Tabla V, este método resultó inadecuado para la cuantificación de azúcares reductores en los medios de fermentación estudiados. La determinación se realizó por triplicado y de forma independiente para cada uno de los ensayos. Originalmente este método, propuesto por Dubois y colaboradores, está reportado para el trabajo con disoluciones acuosas de carbohidratos y en conjunción con cromatografía en papel pero no para su empleo en los sistemas de nuestro interés.

Existen diversos factores que pudieran causar una mala cuantificación de azúcares reductores. Por ejemplo, Koefler (1952) estudió este método en detalle y encontró que la absorbancia determinada es función también de la cantidad de fenol adicionada, mostrándose un incremento gradual hasta llegar a un máximo para luego descender. Esta es otra fuente de error que, aunque es posible evaluar para tratar de eliminarla o al menos disminuirla, hacen al método en general difícil de trabajar.

Método B. Determinación con 2-bifenilamina.

Con objeto de evaluar la linealidad del sistema al emplear este método, se construyó primero una curva de calibración utilizando glucosa en solución tamponada y leyendo a 380 nanómetros. El procedimiento experimental empleado se presenta enseguida y los resultados promedio se muestran en la Gráfica 3:

Gráfica 3



Curva de calibración para glucosa en sol tamponada de acetatos pH 3.50. $r=0.9975$

La ecuación de la recta es la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = 6.45 \times 10^{-4} (\text{concentración}) - 0.012$$

Y la linealidad del método quedó de manifiesto al observar el coeficiente de correlación experimentalmente obtenido (99.75%).

Luego de construir la curva de calibración, se investigó la posibilidad de aplicar este método a las muestras de nuestro interés. Para esto aquí también se adicionó una cantidad conocida de azúcares reductores (50 g/l de glucosa) en varios medios de fermentación y se calculó el porcentaje de recobro obtenido. Los resultados promedio luego de tres determinaciones independientes, se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI. Porcentajes de recobro para glucosa en varios medios de fermentación utilizando el método B.

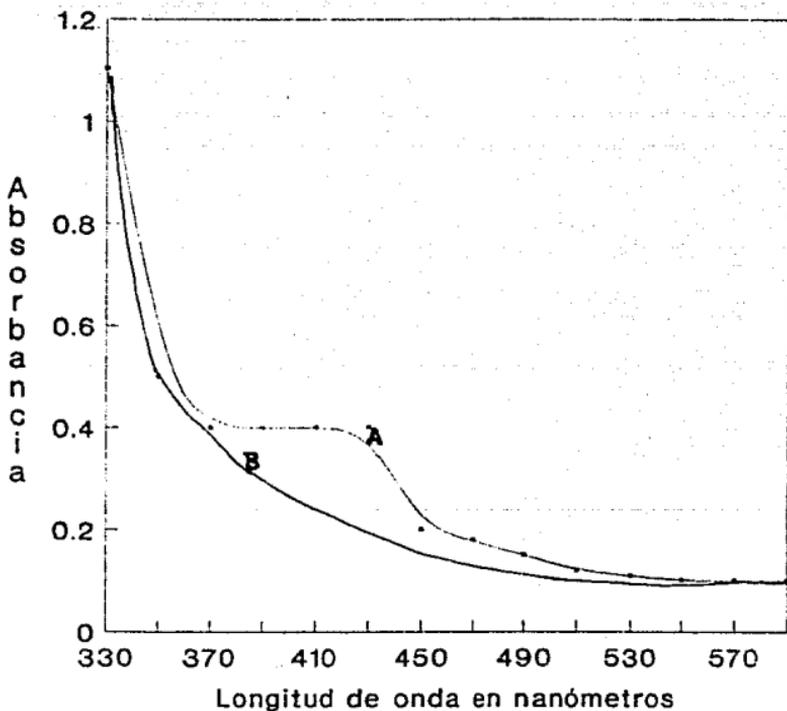
Medio de fermentación empleado	Cantidad de glucosa recuperada (g/l)	% de Recobro
A	43.00	86.00
B	42.50	85.00
C	44.50	89.00
D	42.70	85.40
E	43.00	86.00
F	45.00	90.00
G	44.50	89.00
H	44.50	89.00

De la tabla anterior se observa que este método puede emplearse en las muestras provenientes de los medios de

fermentación aquí estudiados. En vista de ello, se realizaron investigaciones posteriores con objeto de determinar cual es la longitud de onda en la que se presenta un máximo de absorbancia, pues en la literatura consultada no se encontró algún valor reportado. Para esto se utilizaron soluciones acuosas de glucosa de concentración $100 \mu\text{g/ml}$ y el procedimiento seguido fue el propuesto por Christiansen (1986), haciendo también aquí estudios por triplicado.

Los resultados obtenidos del promedio de tres curvas independientemente realizadas son mostrados en la Gráfica 4:

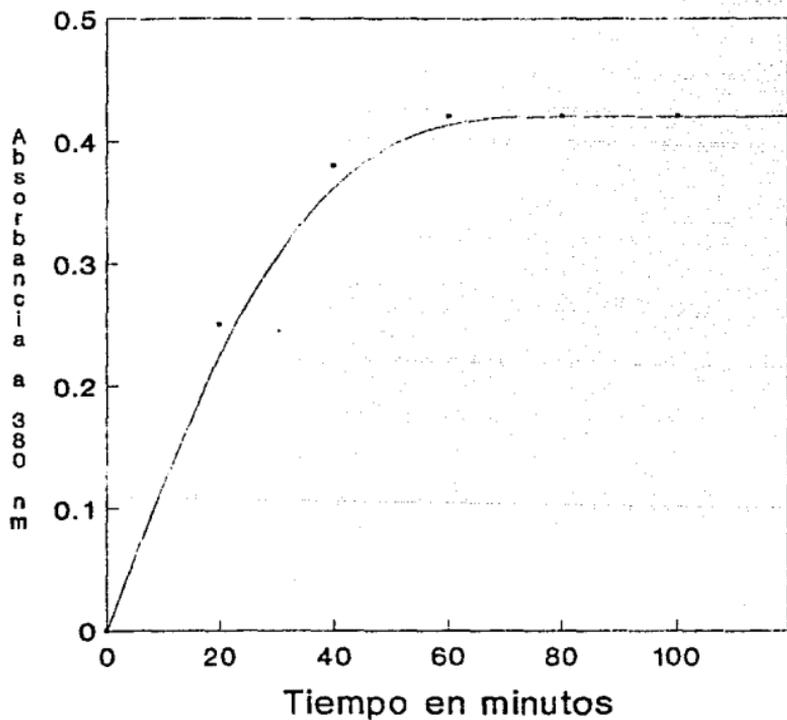
Gráfica 4



Espectro de absorción para glucosa
(A) a conc. 100 µg/ml y para el
blanco (B).

Una vez seleccionada la longitud de onda con que se trabajara en lo subsecuente, fue evaluada la relación existente entre la absorbancia y el tiempo de calentamiento a ebullición para muestras de glucosa en amortiguador de acetatos de pH 3.50. Esto se hizo con objeto de determinar a partir de que momento el color desarrollado durante el calentamiento permanece estable. Los resultados encontrados para el promedio de tres determinaciones hechas de manera independiente, se muestran a continuación en la Gráfica 5:

Gráfica 5



Relación entre la absorbancia y el tiempo de calentamiento para glucosa en sol. amortiguadora pH 4.0 a conc. de 100µg/ml

El haber evaluado el espectro de absorción cuando se usa glucosa como azúcar reductor a ensayar, así como el efecto del tiempo de calentamiento para muestras conteniendo este mismo azúcar, fueron necesarias para establecer una serie de condiciones denominadas estándar al emplear este método y evitar así errores como el provocado por un calentamiento insuficiente de las muestras.

Respecto al reactivo empleado, se encontró que la 2-bifenilamina es poco estable en ácido acético glacial. Se aprecia la formación de un color amarillo luego de dejar ebullición por unos pocos minutos y aún después de hacerlo por más de dos horas. Por esta razón es mejor preparar el reactivo poco antes de emplearse y, como precaución adicional, protegerla de la luz. Con este reactivo las aldohexosas dan una coloración verde. La ramnosa, según la literatura, da una coloración café (Timell, 1956).

No obstante los buenos porcentajes de recobro alcanzados con este método, el compuesto orto-aminobifenilo presenta varios serios inconvenientes: 1) Solamente se consigue de importación por lo que tarda mucho en llegar; 2) Es un reactivo poco común y no muchas compañías lo expenden; 3) El que se encuentra comercialmente posee un muy bajo grado de pureza (38%) por lo que debe purificarse antes de usarse con fines analíticos (Aldrich, 1991); 4) Resulta extremadamente tóxico por inhalación, absorción cutánea e ingestión pues irrita severamente los ojos, el sistema respiratorio y la piel; 5) Existe un alto riesgo de posibles efectos irreversibles, posiblemente disponga a contraer males de tipo carcinogénico y mutagénico (Merck, 1989); 6) En razón de lo

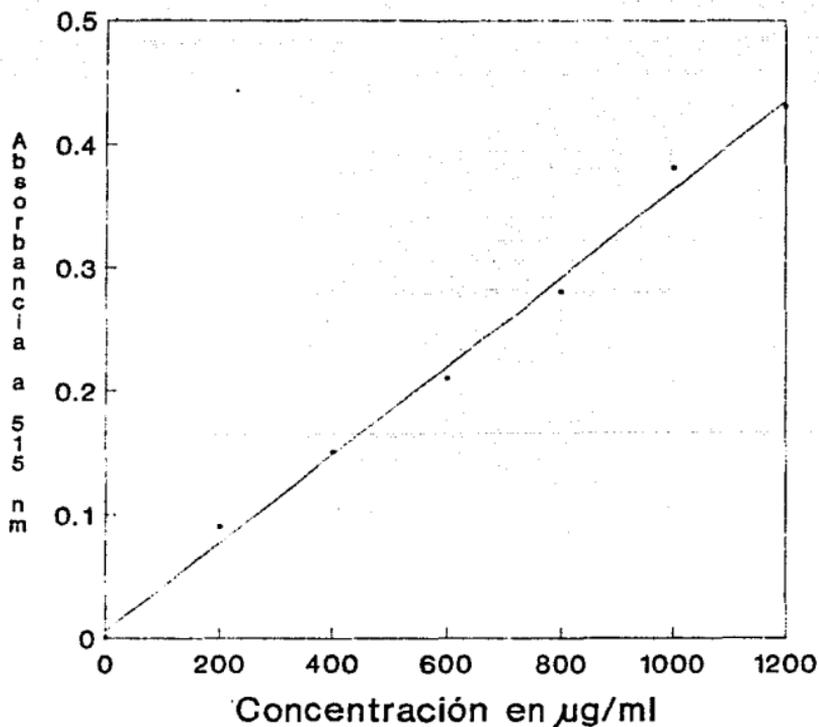
anterior debe manipularse con protección de la cara -principalmente ojos, nariz y boca-, ropa de protección y guantes.

Dados los anteriores inconvenientes, dejó de ensayarse el método de la determinación con 2-bifenilamina con objeto de encontrar uno igualmente adecuado pero con un menor riesgo a la salud asociado con su uso.

Método C. Determinación del ferricianuro.

Al igual que en todos los métodos anteriormente ensayados, primero se construyó la curva de calibración para evaluar la linealidad del sistema. Se utilizó una disolución de glucosa en tampón de acetatos pH 3.50. Las lecturas se realizaron a 515 nanómetros y los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 6 para tres curvas construidas de manera independiente; asimismo, el procedimiento experimental utilizado es el que se presenta enseguida:

Gráfica 6
Curva de calibración



Glucosa en solución amortiguadora de acetatos 0.01 M de pH 3.5. $r=0.9962$

La ecuación de la recta es la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = 5.20 \times 10^{-4} (\text{concentración}) - 0.010$$

El coeficiente de correlación fue de 0.9962. En base a este último se asevera que el método sigue un comportamiento lineal cuando se aplica a soluciones tamponadas de glucosa en el intervalo de 0.0 a 1400 microgramos /ml.

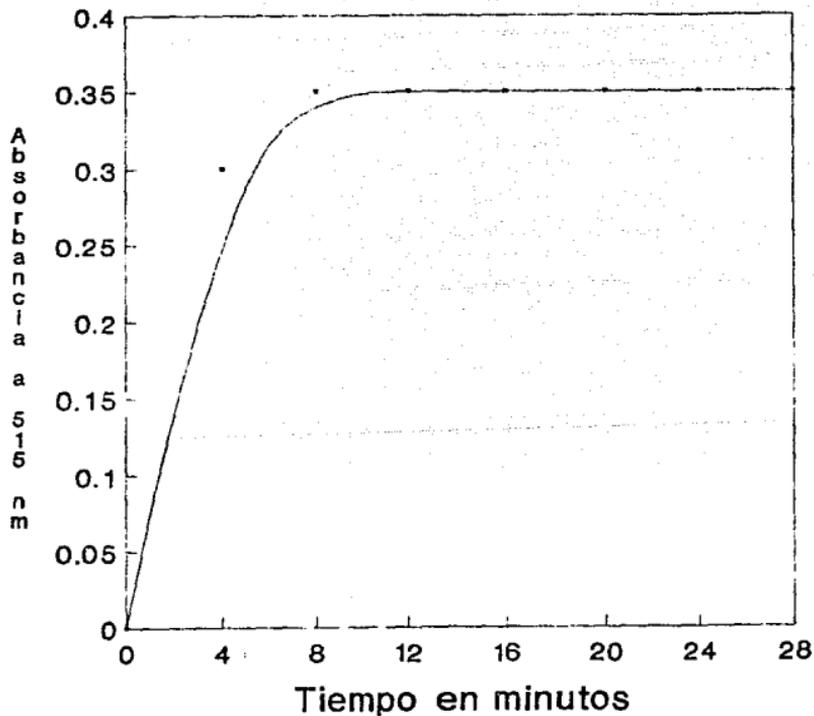
Posteriormente se evaluó la aplicabilidad de este método a la determinación de reductores en los sistemas de nuestro interés. Los resultados promedio del estudio hecho por triplicado son mostrados en la Tabla VII.

Tabla VII. Porcentaje de recobro para glucosa en medios de fermentación utilizando el método de la determinación con ferricianuro.

Medio de fermentación empleado	Cantidad de glucosa recuperada (g/l)	% de Recobro
A	62.00	124.00
B	56.00	112.00
C	52.00	104.00
D	53.00	106.00
E	59.00	118.00

En vista de los anteriores resultados, el método fue revisado con más detalle, encontrándose que el principal factor crítico a considerar era el tiempo de reacción. Por esta razón se hizo un estudio utilizando glucosa en solución acuosa (concentración de 0.1%) la cual se sometió a calentamiento en agua a ebullición y tomando muestras a diferentes tiempos, como se muestra en la Gráfica 7:

Gráfica 7



Efecto del tiempo de calentamiento a 93
C sobre el desarrollo del color para
glucosa a concentración de 100 µg/ml

De la gráfica anterior se aprecia que luego de poco más de cinco minutos de calentamiento, prácticamente no hay ya variación en la absorbancia lo cual indica que la reacción se ha completado. Como en el estudio del porcentaje de recobro se dejaron las muestras ebullicir por diez minutos, entonces deben existir algún tipo de interferencias al aplicar este método en las muestras de nuestro interés. Con objeto de comprobar lo anterior, se realizó un estudio utilizando soluciones acuosas de cada uno de los componentes de los medios de fermentación aquí empleados. Las lecturas se hicieron a 515 nm y los resultados para estudios por triplicado se muestran en la Tabla VIII:

Tabla VIII. Determinación del coeficiente de interferencia para algunos componentes de medios de fermentación al utilizar el método del ferricianuro.

Muestra	% de Transmitancia	Coefficiente de Interferencia
Blanco de agua	99.00	1.00
Extracto de Levadura	55.40	1.78
Extracto de Carne	78.00	1.26
Agua de cocimiento de Maiz	72.00	1.37
Extracto de malta	85.00	1.16
Peptona de Caseína	92.00	1.07

El Coeficiente de Interferencia ha sido ya definido. Como se aprecia, el mayor grado de interferencia se debe, en orden decreciente, al extracto de levadura, agua de cocimiento de maiz, extracto de carne, extracto de malta y peptona de caseína, por lo

que resulta inadecuado utilizar este método analítico en medios de fermentación que contengan estos sustratos.

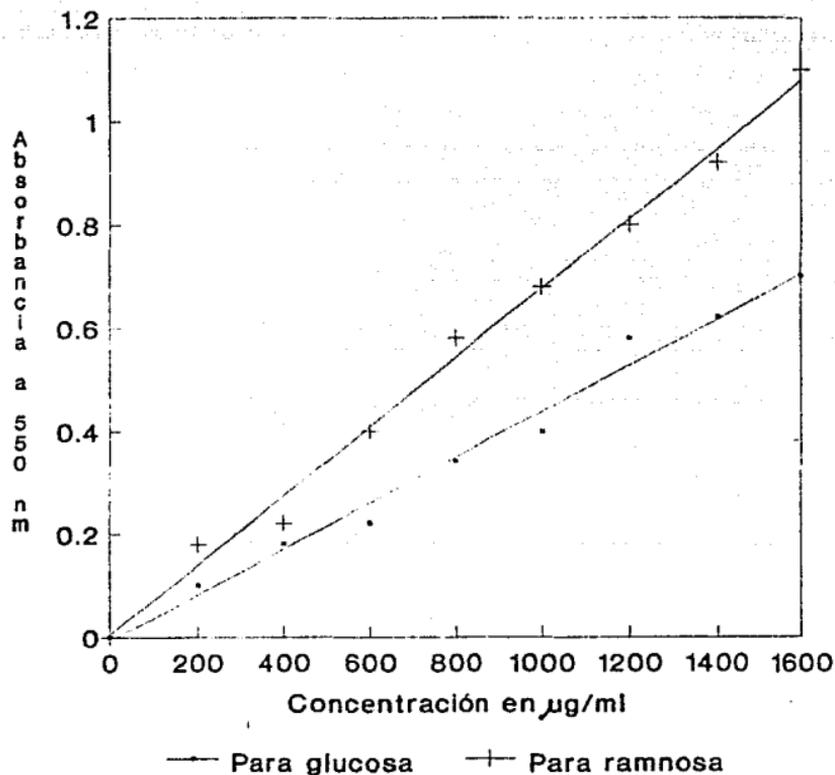
Estos problemas ya se sospechaban puesto que se ha reportado que no existe una diferencia significativa entre la determinación con ferricianuro-molibdato y la determinación volumétrica por el método de Shaffer-Hartmann, lo que indica el grado de resolución que este método puede alcanzar (Shaffer y Hartmann, 1921).

ESTA TESIS NO DEBE -
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Método D. de determinación colorimétrica del ácido 3,5-
dinitrosalicílico.

Al igual que en los anteriores métodos experimentalmente evaluados, se muestra aquí la metodología seguida. Posteriormente se construyeron curvas de calibración para probar la linealidad del sistema. Se utilizaron soluciones de glucosa y de ramosa en amortiguadora de acetatos pH 3.50; los resultados se muestran a continuación en la Gráfica 8 para ambas curvas hechas por triplicado:

Gráfica 8



Curva de calibración para glucosa y ramnosa en solución tamponada acetatos pH 3.5. $r=0.9980$ y 0.9940 respectiv.

Las ecuaciones de las rectas son:

-4

-3

Para glucosa. Absorbancia= 6.72×10^{-4} (concentración) - 9.71×10^{-4}

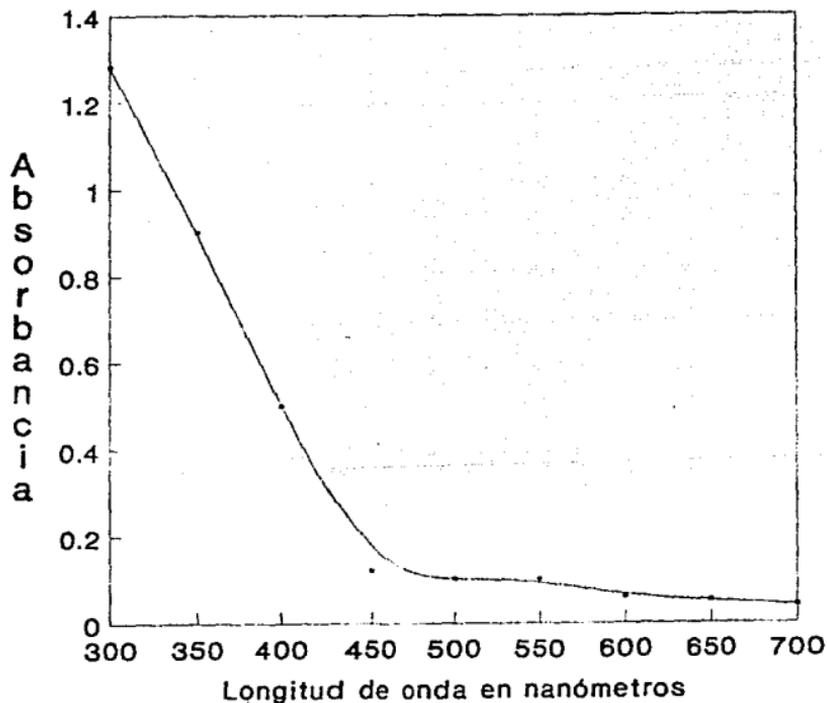
-4

Para ramnosa. Absorbancia= 4.56×10^{-4} (concentración) - 0.071

Como ambos coeficientes de correlación son mayores a 0.994, el método resulta lineal a concentraciones de hasta 1600 microgramos/ml. El hecho de que la curva para glucosa muestre valores más altos de absorbancia que la respectiva para ramnosa, es consistente con lo reportado en la literatura (Hostettler, et al., 1951; Bell, et al., 1952; Meyer, van der Wyk y Deng, 1954). Este comportamiento debe ser considerado al evaluar mezclas de carbohidratos.

En un estudio posterior se determinó la longitud de onda a la cual se tiene un máximo de absorción, pues en la literatura se reportan valores desde 420 hasta 590 nanómetros. Los resultados de este estudio se muestran en la Gráfica 9.

Gráfica 9



Espectro de absorción para glucosa en
solución acuosa a concentración de
100 µg/ml.

Luego de lo anterior, se procedió a estudiar la aplicabilidad del método a muestras provenientes de medios de fermentación. Para ello se adicionó una cantidad conocida de glucosa a varios medios de fermentación (50 g/l) y se calculó el porcentaje de recobro obtenido. Los resultados de este estudio, hecho por triplicado, se muestran en la Tabla IX:

Tabla IX: Porcentaje de recobro alcanzado en la cuantificación de glucosa presente en algunos medios de fermentación al utilizar el método del Ácido 3.5-dinitrosalicílico.

Medio de fermentación empleado	Cantidad de glucosa recuperada (g/l)	% de Recobro
A	43.30	86.60
B	40.95	81.90
C	45.00	90.00
D	42.50	85.00
E	43.00	86.00
F	46.00	92.00
G	44.50	89.00
H	46.00	92.00

En el anterior estudio las lecturas de absorbancia se hicieron a 550 nm y, como muestra la Tabla IX, no se presentaron interferencias al utilizar este método en los medios de fermentación mencionados. Sin embargo, el porcentaje de recobro alcanzado no se considera lo suficientemente adecuado al tratarse de un método analítico. En vista de esto es necesario estudiarlo con más detalle.

1.5. Discusión de Resultados.

Los métodos A, determinación con ácido sulfúrico-fenol y C, determinación con ferricianuro, demostraron ser inadecuados al aplicarse en muestras provenientes de medios de fermentación (como se muestra en la Tablas IV y VIII, respectivamente); el método B, determinación con 2-aminobifenilo, es por su parte de un alto riesgo a la salud por lo que se eligió al método D, determinación con reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico, para realizar la cuantificación de azúcares reductores en medios de fermentación. Una ventaja adicional de este método lo es el que recientemente se reportaron los efectos tóxicos del ácido 3,5-dinitrosalicílico sobre piel, sus posibles efectos causados por acumulación, la acción de este ácido en algunos órganos internos así como algunos otros indicadores bioquímicos (Reznichenko y Vasilenko, 1986).

Sin embargo, dado que aún no se llega a cuantificar con una eficiencia mayor al 90%, como se muestra en la tabla IX, y esta es la eficiencia requerida para un buen método analítico, es necesario realizar más investigaciones para lograrlo. En los siguientes capítulos son descritos la serie de esfuerzos que se realizaron dirigidos en este sentido.

2. Estudio de los factores que afectan la determinación de azúcares reductores con reactivo del ácido 3.5-dinitrosalicílico.

2.1. Introducción.

A pesar de que el uso del reactivo que contiene ácido 3.5-dinitrosalicílico está ampliamente difundido, una revisión en la literatura científica evidenció que en realidad ha sido poco estudiado. Esto quedó demostrado porque en muchos trabajos, dentro del ámbito biotecnológico, en donde este método es empleado, han sido reportados comportamientos extraños que se atribuyeron a muchos factores (por ejemplo, inestabilidad genética en microorganismos recombinantes, condiciones fisicoquímicas durante la fermentación, cambios drásticos en el metabolismo microbiano) pero nunca al método analítico en sí. Por esta razón, y en virtud de que los porcentajes de recobro hasta ahora alcanzados no son del todo satisfactorios, fue necesario evaluar los que son, a nuestro juicio, los factores críticos en este método y poder proponer entonces una serie de condiciones estandarizadas para uniformar criterios.

2.2. Efecto de la Temperatura.

2.2.1 Sobre la velocidad de disolución de los componentes del reactivo.

En la literatura consultada no se menciona una temperatura específica a la cual deba prepararse el reactivo del ácido 3.5-dinitrosalicílico. No obstante, es importante determinarla puesto que la reacción es, desde un punto de vista termodinámico, endotérmica. Por esta razón se creyó conveniente realizar

estudios al respecto y una primera evaluación consistió en la determinación experimental de la velocidad de disolución del DNS respecto a la temperatura. La velocidad de disolución se define aquí como la cantidad de soluto que se solubiliza por unidad de tiempo y en nuestro estudio se utilizó un grano del ácido 3,5-dinitrosalicílico para disolverlo en un volumen constante de agua destilada (20 ml) a diferentes temperaturas.

La expresión matemática que define la velocidad de disolución es la siguiente:

$$\text{Velocidad disol.} = \frac{1 \text{ gramo ácido 3,5-DNS}}{\text{Tiempo de disolución en minutos}}$$

Los resultados obtenidos, luego de determinaciones por triplicado, son mostrados en la Tabla X.

Tabla X. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de disolución en la preparación del reactivo.

Temperatura (°C)	Tiempo de disolución	Velocidad de disolución (g/min)
30	25.1	0.0398
40	23.2	0.0431
50	20.5	0.0487
60	8.2	0.1219
70	6.7	0.1492

2.2.2. En la preparación del reactivo

2.2.2.1. Sobre la intensidad del color producido.

Con objeto de evaluar si la preparación del reactivo a diferentes temperaturas tiene algún efecto sobre la intensidad

del color amarillo que este presenta, se prepararon 50 mililitros del reactivo DNS a las temperaturas abajo señaladas y luego de enfriarse a temperatura ambiente -ya que la absorbancia está en función de la temperatura- (Wilson y Wilson, 1986) se tomaron lecturas del porcentaje de Transmitancia y Absorbancia para cada lote por triplicado y de manera independiente. Los resultados son mostrados enseguida en la Tabla XI.

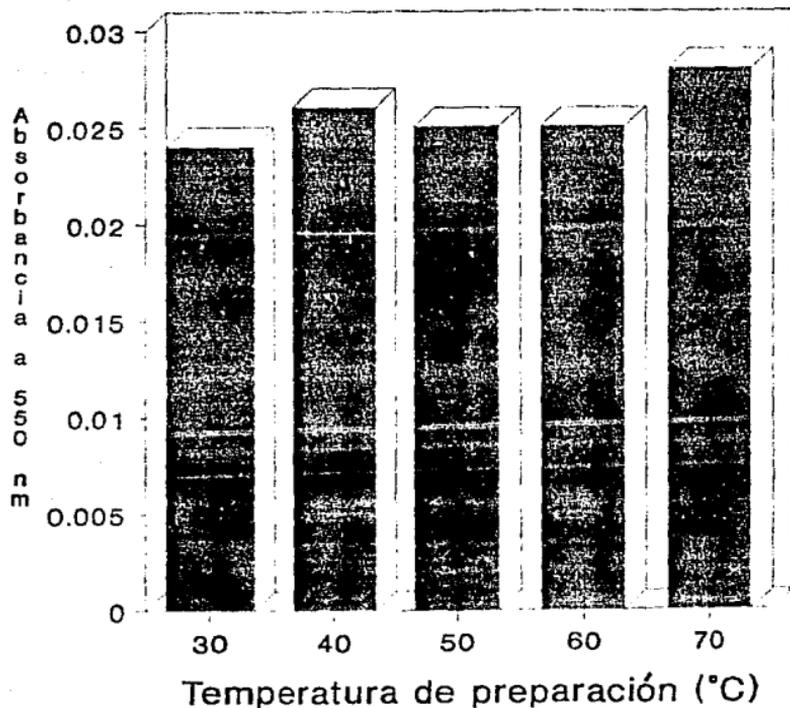
Tabla XI. Valores de absorbancia y transmitancia para reactivo DNS preparado a diferentes temperaturas.

Temperatura de preparación (°C)	%Transmitancia	Absorbancia promedio
30	94.5-94.7	0.024
40	93.9-94.2	0.026
50	94.2-94.5	0.025
60	94.0-94.5	0.025
70	93.6-94.0	0.028

Como se observa de la anterior tabla, la coloración que presentan los diferentes reactivos es muy similar entre sí y la variación más bien puede deberse a errores experimentales.

Graficando los anteriores datos, puede esto apreciarse con más claridad; por esta razón se construyó la Gráfica 10 que a continuación se muestra:

Gráfica 10

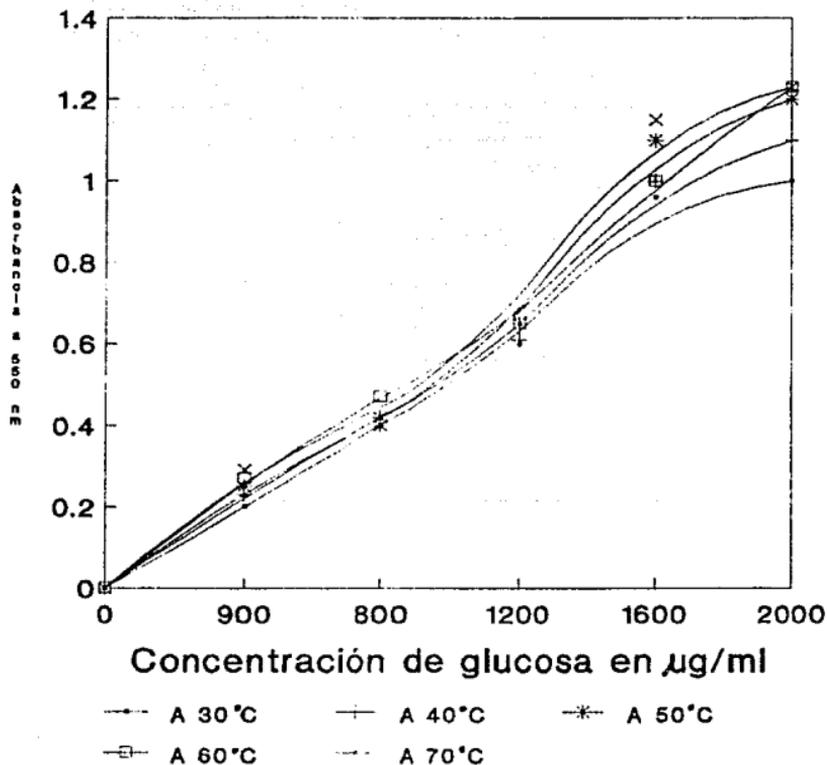


Coloración del reactivo DNS preparado a diferentes temperaturas. Lecturas hecha a 550 nm a 25°C.

2.2.2.2. Sobre la cuantificación de azúcares reductores.

El hecho de que el reactivo preparado a diferentes temperaturas tenga prácticamente la misma intensidad de color no necesariamente significa que se logren cuantificaciones iguales, por lo que esto último deberá evaluarse experimentalmente. En vista de ello un estudio fue realizado utilizando una solución acuosa de glucosa como referencia (concentración 1000 $\mu\text{g/ml}$) para construir curvas de calibración y empleando reactivo DNS preparado a diferentes temperaturas. Los resultados son mostrados en la Gráfica 11.

Gráfica 11



Efecto del DNS preparado a distintas temperaturas sobre la cuantificación de glucosa.

Como se aprecia de la anterior gráfica, se logran diferentes absorbancias, y en consecuencia diferentes concentraciones de glucosa, según la temperatura a la cual el reactivo fue preparado.

Con objeto de demostrar a cual de todas las anteriores temperaturas se logran los mejores porcentajes de cuantificación, se hicieron una serie de experimentos y los resultados promedio, obtenidos de cuatro determinaciones hechas de manera independiente, son los mostrados en la Tabla XII.

Tabla XII. Porcentajes de recobro para glucosa cuantificada con reactivo DNS preparado a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Concentración real (µg/ml)	Cantidad recuperada	% de Recobro
30	400	300	75.00
	800	605	75.62
	1200	1020	85.00
	1500	1120	74.66
	1800	1334	74.11
	400	313	78.25
40	800	700	87.50
	1200	1020	85.00
	1500	1200	80.00
	1800	1990	110.55
	400	315	78.75
	800	690	86.25
50	1200	1050	87.50
	1500	1240	82.66
	1800	1990	110.55
	400	300	75.00
	800	710	88.75
	60	1200	1457
1500		1780	118.66
1800		2010	111.66
400		490	122.50
800		955	119.37
70		1200	1430
	1500	1905	127.00
	1800	2050	113.88

Como se ve en la tabla anterior y en base al porcentaje de recobro encontrado, la temperatura de preparación del reactivo influye grandemente sobre la cantidad de azúcares reductores que se determinan; el reactivo con el cual se tuvieron los mejores porcentajes de recobro fue aquel preparado a 50°C. No obstante, la cantidad de reductores que el método determina aún se considera baja pues es del orden del 80-86% y un método analítico debe cuantificar, idealmente, al 100% de la cantidad presente. Esto obliga a realizar posteriores estudios con objeto de lograr mejoras al presente método.

2.2.3 Discusión

En la evaluación que el efecto de la temperatura tiene sobre el método, se encontró primeramente que la velocidad de disolución del ácido 3,5-dinitrosalicílico es directamente proporcional a ésta pero al parecer no afecta en la intensidad del color amarillo que el reactivo preparado presenta, según los resultados mostrados en las Tablas X y XI. Sin embargo, una evaluación del porcentaje de recobro alcanzado al emplear reactivo preparado a distintas temperaturas mostró grandes diferencias en la cuantificación de glucosa como se aprecia en la gráfica II. Debe entonces tenerse cuidado al preparar el reactivo DNS a una determinada temperatura. Este fenómeno no es algo nuevo pues el mismo comportamiento ha sido encontrado en algunos otros métodos colorimétricos (Williams y Flemming, 1987). Según una serie de experimentos, los mejores porcentajes de recobro se obtienen al utilizar reactivo preparado a 50°C. No obstante, las cantidades determinadas aún se consideran bajas, por lo que este

método analítico debe ser estudiado más profusamente -y esto implica evaluar más factores- con objeto de mejorarlo y lograr finalmente mejores cuantificaciones que es lo que se pretende de todo método químico analítico.

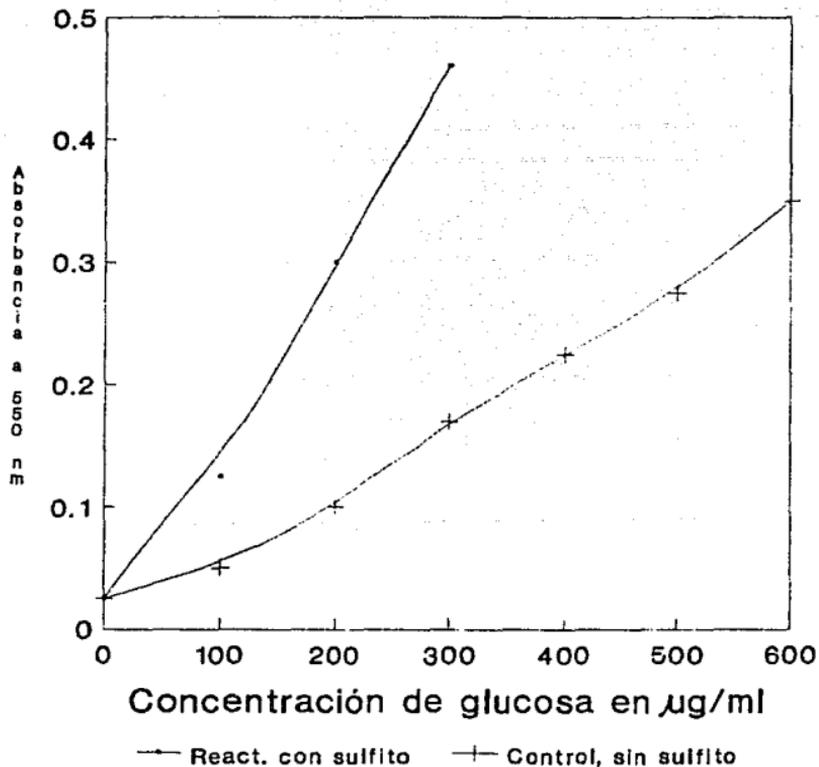
2.3. Efecto de la composición del reactivo.

Actualmente existen discrepancias sobre la composición óptima del reactivo y diferentes laboratorios de investigación biotecnológica poseen distintas formulaciones. En ninguno de ellos se ha dado una explicación satisfactoria del porque se utiliza rutinariamente a cierta concentración no obstante que se han detectado problemas cuando se determinan azúcares reductores con él. En vista de lo anterior, se consideró necesario evaluar a cada uno de los componentes presentes, para lo cual se hicieron estudios por triplicado para cada componente estudiado. Las razones que justifican la adición de dichos componentes al reactivo ya se han mencionado antes en la sección correspondiente a descripción de métodos.

2.3.1. Efecto de la presencia del sulfito sódico.

Primeramente se evaluó el efecto que tiene la adición del sulfito de sodio al reactivo, para lo cual se comparó contra DNS que no lo contuvo. El comportamiento observado es el mostrado en la Gráfica 12.

Gráfica 12



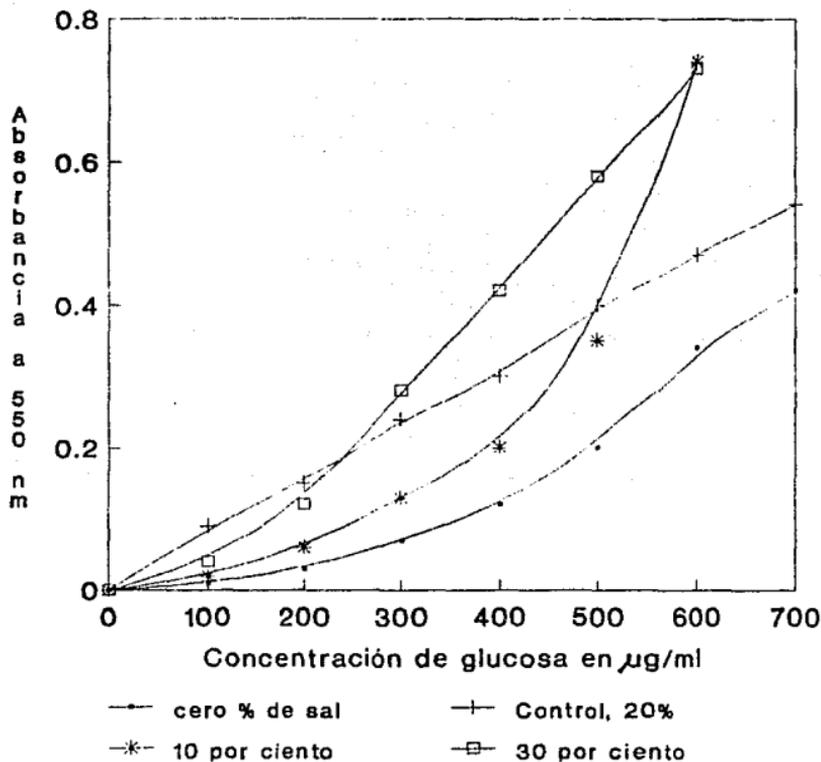
Efecto del sulfito sódico sobre la eliminación del oxígeno disuelto. El sulfito se añadió al 0.1%

Como se aprecia de la gráfica anterior, el tratamiento con sulfito sódico no logró la eliminación de una buena parte del oxígeno disuelto, como era de esperarse. Esto es claramente visible por la desviación de la tendencia lineal. El comportamiento anterior puede deberse a la interacción del sulfito con otros componentes del reactivo y no únicamente con el oxígeno molecular.

3.3.2. Debido a la concentración de la sal de Rochelle

La sal de Rochelle (o tartrato de sodio y potasio, como generalmente se le conoce) es el compuesto más abundante del reactivo. En una serie de experimentos realizados, se detectó que la sal de Rochelle es el componente del reactivo que vuelve un tanto ineficaz al sulfito de sodio en la eliminación del oxígeno disuelto pues en ausencia de tartrato el bisulfito es capaz de eliminar mayor cantidad de oxígeno molecular disuelto y proteger más efectivamente a la glucosa de la oxidación por este elemento. No obstante, el tartrato de sodio y potasio es necesario para estabilizar el color desarrollado durante la reacción por lo que no puede eliminarse del reactivo. Sin embargo, lo que sí puede hacerse es encontrar cual es la mínima cantidad de tartrato que se requiere para que el reactivo siga manteniendo una tendencia lineal cuando se aplica a azúcares reductores. Los resultados de una serie de experimentos realizados con dicho propósito son mostrados en la Gráfica 13.

Gráfica 13



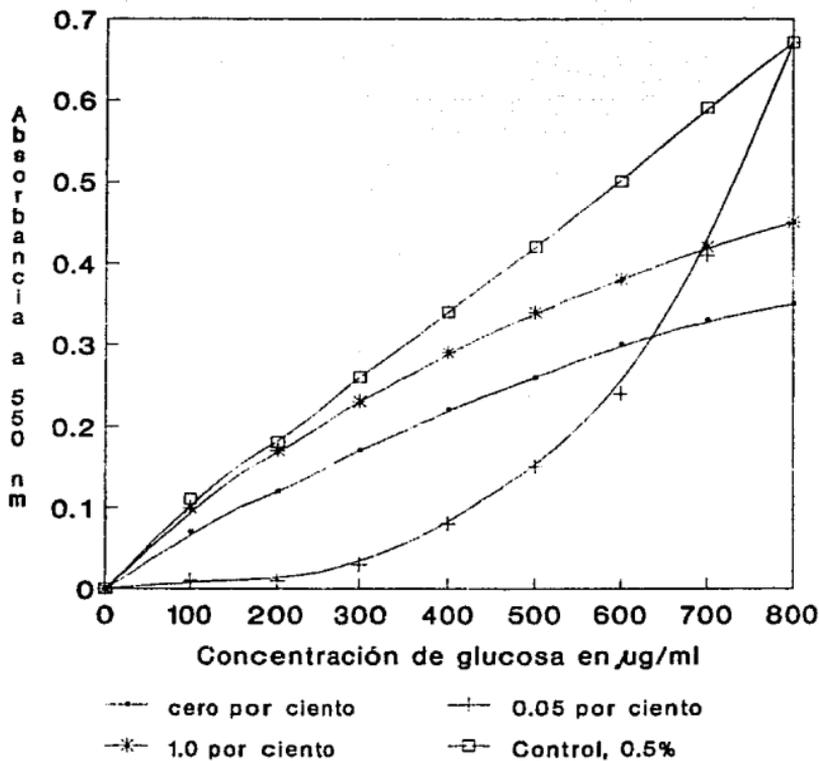
Efecto de la concentración de la sal de Rochelle sobre la intensidad del color producido

Los resultados mostrados en la gráfica anterior indican que el empleo de tartrato de sodio y potasio a una concentración del 20% resulta adecuada para estabilizar el color desarrollado (los resultados de esto se discuten más adelante) y mantener al método dentro de un comportamiento lineal.

2.3.3. Efecto de la concentración del bisulfito sódico

Con objeto de determinar cuál era el efecto de diferentes concentraciones de bisulfito sódico en el reactivo DNS se hicieron una serie de experimentos y los resultados encontrados se presentan en la Gráfica 14.

Gráfica 14



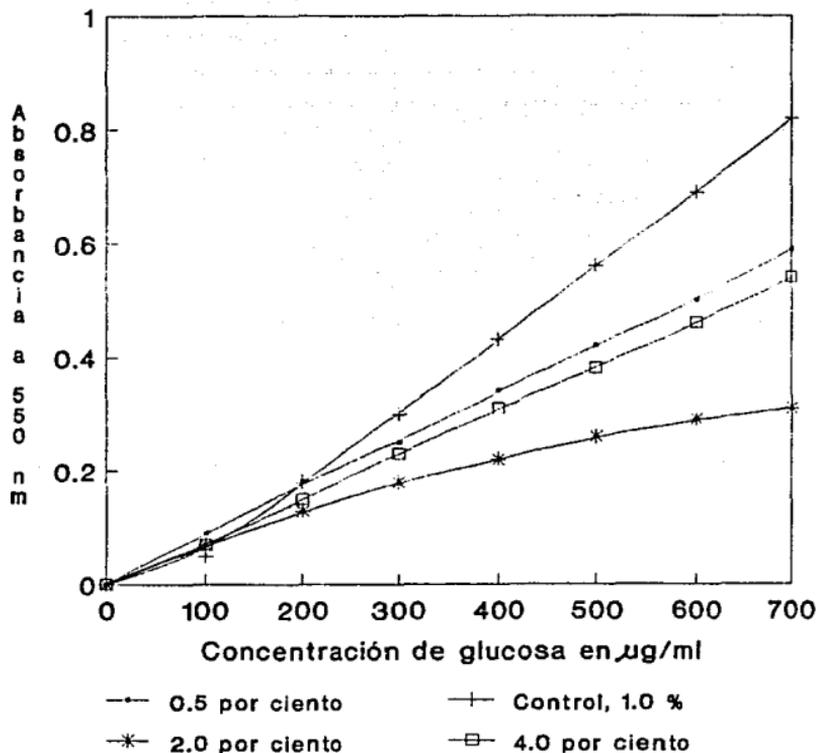
**Efecto de la cantidad de bisulfito
sódico adicionado sobre la intensidad de
color producido**

Los resultados mostrados en la Gráfica 14 indican que la máxima intensidad del color desarrollado luego de la reacción con glucosa se tiene al emplear bisulfito de sodio al 0.5%. Este mismo comportamiento se encontró al emplear bisulfito al 1.0% pero no se ha mostrado en la gráfica. El uso de bisulfito a concentraciones tan bajas como 0.005% produce una falta de linealidad.

2.3.4. Efecto de la concentración del hidróxido de sodio

El efecto que diferentes concentraciones de hidróxido sódico tienen sobre la intensidad del color desarrollado se muestra en la Gráfica 15.

Gráfica 15



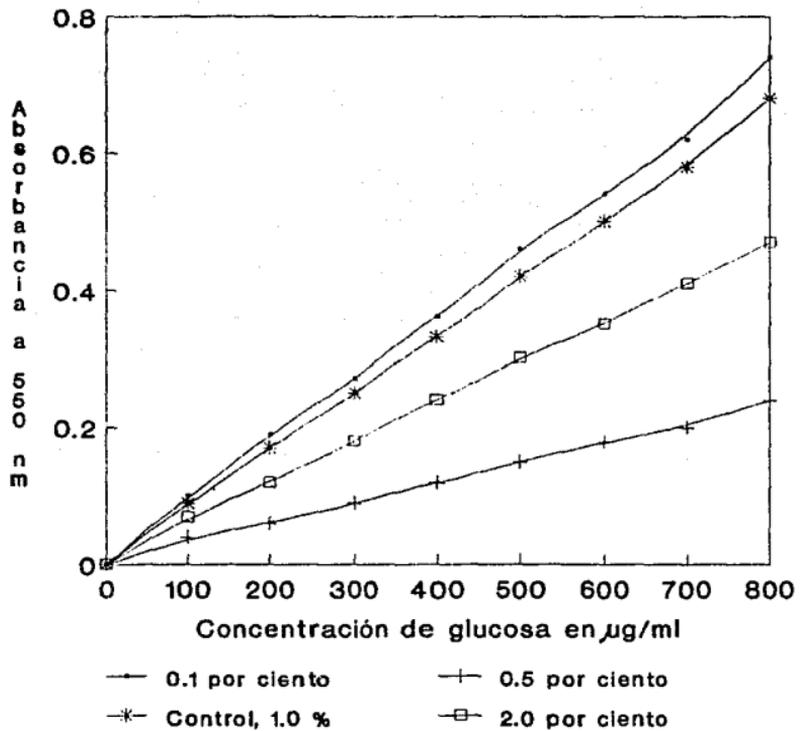
Efecto de la cantidad de hidróxido de sodio sobre la intensidad de color producido

Las altas concentraciones del álcali incrementan la intensidad del color desarrollado pero al mismo tiempo contribuyen a una desviación sensible de la linealidad, como muestra la Gráfica 15. El uso del hidróxido sódico a una concentración del 1.0% parece ser lo más conveniente pues se produce un máximo en la intensidad del color y no disminuye la linealidad (aparente) del método.

2.3.5. Efecto de la concentración del ácido 3,5-dinitrosalicílico

Respecto a cuál es la concentración mínima del ácido 3,5-DNS que asegura los mejores resultados, una serie de estudios fueron hechos. En la gráfica 16 se muestran dichos resultados.

Gráfica 16



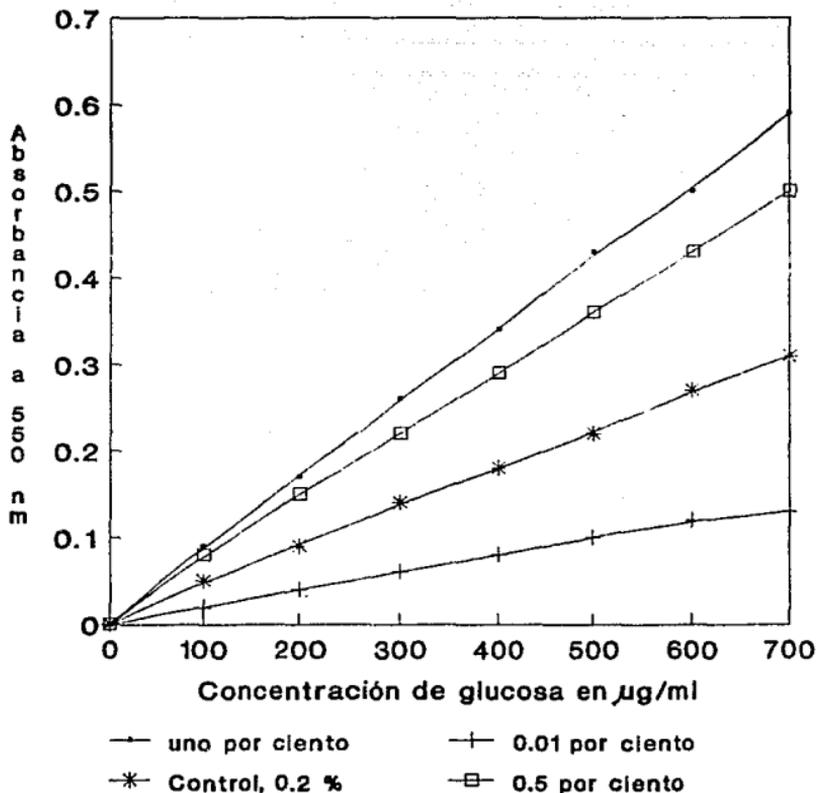
Efecto de la cantidad de ácido 3,5-dinitrosalicílico sobre la intensidad del color producido

La Gráfica 16 muestra que la máxima intensidad de color desarrollado luego de la reacción con glucosa se tiene al emplear el ácido 3.5-dinitrosalicílico a una concentración del 1.0%. A concentraciones menores se presenta nuevamente una clara desviación de la tendencia lineal.

2.3.6. Efecto de la concentración de fenol

De igual manera que para el estudio de los otros componentes, se preparó reactivo conteniendo distintas concentraciones de fenol. Los resultados de estas investigaciones se muestran en la Gráfica 17.

Gráfica 17



Efecto de la cantidad de fenol sobre la intensidad del color producido

La Gráfica 17 muestra que el máximo desarrollo de color, luego de la reacción con el azúcar reductor, se logra utilizando fenol a concentración del 0.5%. Concentraciones menores a ésta conducen a una marcada falta de linealidad. Es interesante destacar que con fenol al 0.2% se logró una intensidad en el color desarrollado luego de la reacción aproximadamente cinco veces mayor que en su ausencia.

Comparando la formulación hasta hoy empleada con la aquí propuesta, se tiene lo siguiente:

Formulación Propuesta		Formulación de Rutina
Tartrato Na y K	20.0%	21.6%
Sulfito de sodio	0.50%	0.59%
Hidróxido sódico	1-2.0%	1.40%
DNS	0.5%	0.65%
Fenol	0.5%	0.54%

2.3.7. Discusión

Del estudio anterior, se aprecia claramente qué importante resulta la composición del reactivo al utilizar el método del DNS para cuantificar azúcares reductores. Cada uno de los diversos componentes presenta fuertes desviaciones de un comportamiento lineal según sea la concentración a la cual se emplea. Como consecuencia de esto, el método también deja de seguir una tendencia lineal lo cual explica, al menos en parte, la serie de

discrepancias que diversos investigadores han tenido al aplicar este método en sus análisis. Los resultados mostrados en las gráficas 12 a 17 ayudan en la resolución de estas diferencias. La composición que aquí se encontró ser la más adecuada no difiere mucho respecto a la propuesta en las formulaciones hasta hoy utilizadas en algunos otros laboratorios.

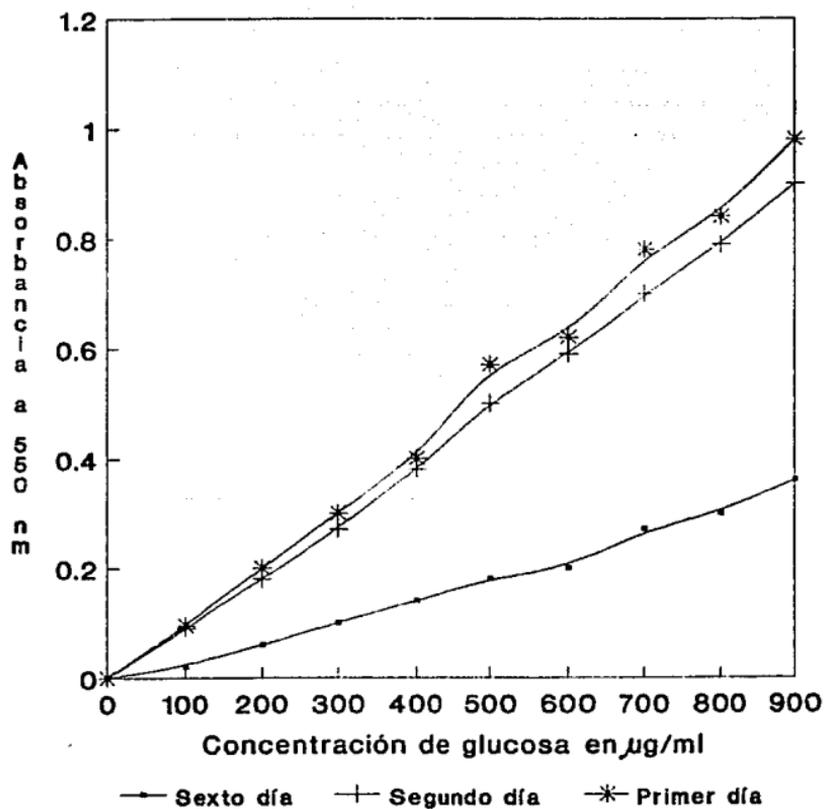
Los resultados aquí presentados pueden ser utilizados como referencia para formular un reactivo DNS más confiable y quizá el comportamiento encontrado aquí explique también la razón por la que se han reportado pérdidas durante la cuantificación (Bridersen y Ricketts, 1949; Miller, Blum y Glennon). La composición del reactivo encontrada aquí como más adecuada no varía en más de un 20% de la anteriormente propuesta, lo que minimiza algún error debido a este factor.

2.4. Estabilidad del color luego de la reacción

2.4.1. Respecto al tiempo.

Es una condición inicial contar con un método analítico colorimétrico en donde el color desarrollado, luego de la reacción, sea estable. Esto debido a que, cuando es necesario el análisis de un gran número de muestras, no siempre pueden evaluarse rápidamente y un color poco estable se convierte así en una gran fuente de error. Por esta razón fue necesario evaluar experimentalmente la estabilidad del color desarrollado luego de la reacción del DNS con un azúcar reductor, en este caso glucosa. Los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 18:

Gráfica 18



Variación de la absorbancia con respecto al tiempo

2.4.2. Discusión

Como se aprecia del análisis de la Gráfica 18, el color desarrollado luego de la reacción es lo suficientemente estable como para hacer lecturas confiables, sin ningún problema, aun después de cinco horas de iniciada aquella. Al cabo de veinticuatro horas el coeficiente de extinción varió sólo entre 0.02-0.04 unidades de absorbancia, lo que claramente indica el grado de estabilidad del color desarrollado (se sabe que el coeficiente molar de extinción mantiene una relación directamente proporcional con la absorbancia (Silvester, Bassier y Morrill, 1987). Esta gran ventaja se presenta en relativamente pocos métodos analíticos colorimétricos, por lo que se hace énfasis en su importancia.

3. Optimización del método del DNS mediante el empleo del método estadístico de Box-Wilson.

3.1. Tratamiento de datos y resultados.

La matriz que se plantea para el método de Box-Wilson, cuando se utilizan tres variables con dos niveles cada, es la mostrada en la Tabla XIII:

Tabla XIII. Matriz planteada para tres variables con dos niveles cada una según el método de Box-Wilson.

Interacción de variable	No. de experimento	V a r i a b l e s		
		A	B	C
(1)	1	-	-	-
a	2	-	-	+
b	3	-	+	-
ab	4	-	+	+
c	5	+	-	-
ac	6	+	-	+
bc	7	+	+	-
abc	8	+	+	+

En donde:

a= volumen del reactivo en la determinación.
b= tiempo de reacción.
c= tiempo de reposo luego de la reacción.

Para las anteriores variables se tomaron como centro experimental los valores hasta hoy utilizados rutinariamente. Dichos valores son: un mililitro, cinco minutos y quince minutos, respectivamente.

En la asignación de los niveles alto (+) y bajo (-) para cada una de las variables, se consideró como máximo aceptable una variación del 40%. Así entonces, el diseño que se planteó fue el mostrado en la Tabla XIV:

Tabla XIV. Niveles superior e inferior para cada una de las variables estudiadas.

	V a r i a b l e s		
	A	B	C
Centro experimental	1	5	15
Unidad de variación	0.4	2	6
Nivel superior	1.4	7	21
Nivel inferior	0.6	3	9

Sustituyendo los valores de las variables en sus niveles alto (+) y bajo (-) en la matriz planteada, se tiene la matriz desarrollada, ésta se muestra enseguida en la Tabla XV:

Tabla XV. Matriz desarrollada que muestra los valores de los niveles alto y bajo para las variables estudiadas.

Interacción de variable	No. de experimento	V a r i a b l e s		
		A	B	C
(1)	1	0.6	3	9
a	2	0.6	3	21
b	3	0.6	7	9
ab	4	0.6	7	21
c	5	1.4	3	9
ac	6	1.4	3	21
bc	7	1.4	7	9
abc	8	1.4	7	21

Para realizar los experimentos luego de planteada la matriz, debe elegirse un intervalo de concentraciones. Aquí se eligieron las concentraciones de 0.8, 2.4 y 4.0 mg/ml por considerarse baja, media y alta respectivamente según el grado de correlación entre datos observado al construir la curva estándar. Los experimentos se realizaron por triplicado y en la Tabla XVI se muestran los valores promedio para glucosa en solución acuosa.

Tabla XVI. Evaluación experimental de la matriz planteada para el método de Box-Wilson.

Interacción de Variables	Número de experimento	Concentración (mg/ml)		
		0.8	1.4	4.0
(1)	1	0.17	1.02	1.57
a	2	0.27	1.08	1.82
b	3	0.80	2.45	3.92
ab	4	0.87	2.49	3.92
c	5	0.84	2.67	4.49
ac	6	0.86	2.67	4.18
bc	7	1.00	1.83	4.70
abc	8	0.99	2.85	4.83

Las concentraciones se obtuvieron de las medias de la Absorbancia determinada a 550 nm y el posterior empleo de la curva de calibración para glucosa utilizando el método del DNS para la cual el valor de los parámetros ya se reportó aquí.

Analizando los datos mostrados en la Tabla XVI, se aprecia que el tratamiento b es el que muestra la menor variación, en todos los casos, al comparar la cantidad agregada contra la cantidad recuperada (0.22, 2.11 y 1.86% de variación, respectivamente) por lo que se utilizó este tratamiento como referencia para nuevos experimentos.

La metodología ahora empleada fue aquella que se conoce como "etapa de ascenso", la cual se basa en el cálculo de los coeficientes de regresión para este método. Dichos coeficientes se emplean como base para calcular las variaciones que presentan las variables estudiadas (Kassart y Dijetska, 1978).

Para determinar los valores del rango de variación, los coeficientes de regresión lineal se multiplican por la unidad de variación y al valor más alto se le asigna un valor unitario; posteriormente se toma como referencia para calcular los valores de las otras variables. Así entonces, son obtenidos los resultados mostrados enseguida:

Para la concentración de 0.8 µg/ml:

	V a r i a b l e	
	B	C
Coefficiente de Regresión	0.2412	0.0817
Unidad de Variación	2	6
Producto Unidad de variación por Coef. de regresión	0.4826	0.4906
Nueva unidad de Variación	0.98	-1.00

Para la concentración de 2.40 µg/ml:

	V a r i a b l e	
	B	C
Coefficiente de Regresión	0.5893	0.2135
Unidad de Variación	2	6
Producto Unidad de variación por Coef. de regresión	1.1787	1.2810
Nueva Unidad de Variación	0.92	1.00

Para la concentración de 4.00 µg/ml:

	V a r i a b l e	
	B	C
Coefficiente de Regresión	0.8731	0.3418
Unidad de Variación	2	6
Producto Unidad de variación por Coef. de regresión	1.7462	2.051
Nueva Unidad de Variación	0.85	1.00

Si calculamos ahora el valor promedio de la nueva unidad de variación para la variable b, se tiene que:

$$\text{Valor promedio} = 0.9167$$

Y para calcular cuál es ahora el intervalo de los nuevos niveles de variación, se adoptan valores entre 1/3 y 3/4 de los valores promedios para B y C. De esta manera, fue necesario realizar nuevos experimentos, de los cuales se muestran a continuación los resultados encontrados cuando se utilizó glucosa a concentración de 0.8 mg/ml.

Número de Experimento		Variable	
		B	C
(1)	Centro experimental	7	9
	Unidad de Variación	0.458	0.500
(2)	Nuevos intervalos de variación	7.458	8.500
(3)		6.540	9.500
(4)		6.540	9.000
(5)		7	9.500

Los anteriores intervalos de variación se sustituyen en la ecuación de la recta obtenida para glucosa a concentración de 0.8 mg/ml, obteniéndose los resultados siguientes:

Número de Experimento	Concentración de glucosa (mg/ml)
1	0.8393 *
2	0.9054
3	0.7776
4	0.7686
5	0.8460

*Centro experimental

De los resultados anteriores puede verse que cuando la variable b se encuentra en su nivel más bajo y C se varia en media unidad (experimentos 3 y 4), la concentración que se determina es baja; cuando B se aumenta en un valor de 1/4 de unidad y C se varia en una unidad (experimentos 2 y 5) las determinaciones resultan altas; cuando B y C están en el centro experimental (experimento 1) nuevamente las determinaciones resultan altas pero comparativamente menores que las encontradas en los experimentos 2 y 5. Lo anterior indica que el intervalo de variación de B se encuentra entre el nivel bajo y el centro experimental, esto es, entre 6.54 y 7.0.

El intervalo fraccional que se debió entonces manejar fue de 6.77 y, cuando C se mantuvo constante, los resultados fueron los mostrados en la Tabla XVII:

Tabla XVII. Valores encontrados para los intervalos de variación según el método de Box-Wilson.

Concentración (mg/ml)	Valores para intervalo de variación (mg/ml)
0.80	0.8035
2.40	2.3980
4.00	3.5538

De todo el procedimiento matemático anterior, se desprende que los valores de los factores estudiados con los cuales se deben obtener los mejores resultados son:

a (volumen del reactivo DNS) = 1.00 ml

b (tiempo de reacción) = 6.77 minutos

c (tiempo de reposo antes de leer) = 9.00 minutos

Estos valores no difieren mucho de los hasta ahora utilizados; dichos valores son: 1.0 ml de volumen de reactivo, 5 minutos de someter a calentamiento y 10 minutos de espera antes de leer la muestra.

3.2. Discusión

El uso del método de Box-Wilson es una herramienta muy empleada en optimización de procesos y, por sus características, se considera aplicable aquí. Si bien el método de Box-Wilson, como todo experimento factorial, presenta varias desventajas, éstas resultaron ser menores que las ventajas obtenidas.

Según mostraron una serie de resultados de todo aquello que no se incluyó en las ecuaciones de regresión, los residuos fueron de un valor muy cercano a cero, lo que prueba que el modelo refleja cercanamente lo que ocurre en realidad. La estrategia seguida para demostrar lo anterior se conoce como análisis residual. Asimismo, resulto conveniente ajustar los datos a una recta de regresión lineal, pues fue posible, con relativa facilidad, conocer los valores de los efectos para cada uno de los factores estudiados y dar, consecuentemente, los niveles óptimos de variación para dichos factores. Esto fue posible tanto para los factores considerados individualmente como para las diferentes interacciones entre ellos. Durante el desarrollo de los diferentes experimentos, una vez planteada la matriz mostrada en la Tabla XIII fue importante considerar sobre que intervalo de concentraciones de azúcares reductores debiera trabajarse. La elección de las concentraciones utilizadas siguió el criterio de

la correlación entre datos. Esta correlación es alta ($r=0.99$) hasta la concentración de 4.0 mg/ml por lo que éste valor se consideró el límite superior. En las determinaciones de azúcares reductores utilizando reactivo DNS, éste fue preparado a las concentraciones que mostraron ser las mejores según los estudios hechos anteriormente y que se muestran en las Tablas XIV a XVII. Las lecturas se realizaron a 550 nm.

Una vez optimizado el método que emplea el reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico, se considera necesario seguir evaluándolo según criterios matemático-estadísticos. Uno de los más importantes a considerar, para cualquier método analítico, es sin duda alguna la validación del mismo. En Ingeniería suele emplearse el Algoritmo de Yates, un procedimiento matemático demasiado elaborado, si se compara con los parámetros utilizados en validación y con prácticamente la misma efectividad (Daniel, 1980). Por este motivo no se ahondará en él aquí.

4 Prevalidación del método que ocupa el reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico.

5.1. Evaluación experimental de parámetros.

Aquí fue realizada la prevalidación del método analítico del DNS, consistente en evaluar algunos de los parámetros utilizados en validación. Para validar un método analítico deben efectuarse estudios más completos y que incluyen, por ejemplo, la calificación del equipo instrumental empleado (tal como colorímetros y espectrofotómetros) lo cual no fue hecho en este trabajo. En virtud de lo anterior nos referiremos a los estudios realizados como prevalidatorios.

La evaluación de cada uno de los parámetros en validación se lleva a cabo mediante cálculos de matemática estadística. El universo de datos manejados para este fin fueron los mostrados en la Tabla XVIII:

Tabla XVIII. Datos empleados durante los estudios prevalidatorios del método analítico que ocupa el reactivo del DNS.

mg de glucosa añadidos	mg de glucosa recuperados	% de recuperación
20	20.6	103.0
20	20.4	102.0
20	20.9	104.5
50	51.9	103.8
50	50.8	101.6
50	50.7	101.4
90	90.4	100.4
90	90.6	100.6
90	90.8	100.8
100	100.7	100.7
100	99.9	99.9
100	99.8	99.8
110	110.0	100.0

Tabla de datos (continúa):

110	109.9	99.9
110	109.7	99.7
120	120.0	100.0
120	120.6	100.5
120	120.5	100.4

	Analista 1	Analista 2
	100.21	99.98
	100.61	99.67
Día 1	100.89	100.15
	100.26	100.15
	100.61	100.70
	100.00	100.26
	100.01	100.47
Día 2	100.60	99.60
	100.20	99.97
	100.71	99.67

4.1.1) Especificidad

Respecto a especificidad, se ha mencionado ya que cada uno de los métodos preliminarmente seleccionados se ensayó en diversos medios de fermentación. El método con reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico es el que mostró la mayor especificidad en estos sistemas, como lo demuestra el Coeficiente de Interferencia experimentalmente obtenido .

4.1.2) Linealidad

Empleando los datos μg de glucosa añadidos contra porcentaje de recuperación se hizo el siguiente tratamiento:

$$n=18 \quad Ex=1470 \quad Ey=1478.20 \quad Ex2=142500$$

$$Ey2=143504.48 \quad Exy=142998$$

Esto es:

$$A=1.080029$$

$$S_x=36.3398$$

$$B=0.993253$$

$$S_y=36.0648$$

$$r=0.999922$$

$$S_{y/x} = \frac{E_y - A(E_x) - B(E_{xy})}{n}$$

$$S_{y/x} = \frac{143504.48 - 1(1.080029)(1478.20) - 10.992353(142998)}{18}$$

$$S_{y/x} = 3.4317/18$$

$$S_{y/x} = 0.436640$$

$$S_{y/x} = \frac{n}{n-2} * S_{y/x}$$

$$S_{y/x} = \frac{18}{16} (0.436640)$$

$$S_{y/x} = 0.463127$$

Se emplea como estadígrafo de contraste la distribución t de Student:

$$t_{\text{calc}} = \frac{(n-m_0) S_x * n-1}{S_{y/x}}$$

$$t_{\text{calc}} = (0.992353 - 1.0) / (36.3398)^{-1/2} = -0.436640$$

$$t_{\text{calc}} = -2.62393$$

Debe ahora buscarse la t de tablas para cotejarla contra la calculada aquí.

La t de tablas con $\alpha/2 = 0.975$ grados de libertad $= n - 2$

reportada así, fue la siguiente: t de tablas = 1.7396

Como la t calculada es menor que la t de tablas, se acepta la hipótesis nula (H_0) por lo que el método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

Y para calcular el intervalo de confianza:

$$m - t \frac{S_{y/x}}{\sqrt{n-1}} < m < m + t \frac{S_{y/x}}{\sqrt{n-1}}$$

$\frac{S_{y/x}}{\sqrt{n-1}}$

$$0.992353 - [(0.003114)2.1199] < 1.0 < 0.992353 + [(0.003114)2.1199]$$

Entonces:

$$0.9857505 < 1.0 < 0.998955$$

4.1.3) Limite de cuantificación.

Respecto a este parámetro estadístico, este se encuentra en aproximadamente los 30 $\mu\text{g/ml}$, lo cual es una cantidad muy pequeña respecto a la cantidad de reductores que presenta un medio de fermentación. No obstante, es importante conocerlo -además de la exigencia al validar el método- porque puede ser empleado para medir consumo de azúcares por parte de los microorganismos cuando se estudia una vía metabólica en particular.

4.1.4). Exactitud.

Se emplearon los siguientes datos:

$$n=10 \quad \bar{X}=999.75 \quad \sum_{i=1}^n X_i = 99950.19 \quad \bar{x} = 99.975$$

El estadígrafo de contraste que se emplea aquí es la distribución t de Student.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{D.E.}{\sqrt{n}}}$$

$$t = \frac{99.975 - 100}{\frac{0.1447}{\sqrt{10}}} \quad t = -0.0546341$$

La desviación estándar se define así:

$$D.E. = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$D.E. = \frac{(100.21-99.97)^2 + (100.61-99.97)^2 + \dots + (99.67-99.97)^2}{9}$$

$$D.E. = \frac{0.18845}{9}$$

$$D.E. = 0.1447027$$

La t de tablas con $\alpha/2$ grados de libertad=9 es de:

$$T \text{ tablas} = 2.2662$$

Y el área de aceptación es:

$$-2.2662 < 0.1447027 < 2.2662$$

Como la t de tablas es mayor que la t calculada, se acepta H_0 y el método es entonces exacto.

4.1.5).Precisión.

4.1.5.1) Repetibilidad.

El estadígrafo de contraste empleado aquí es el coeficiente de variación.

Este se define de la siguiente manera:

$$C.V. = \frac{0.144702}{99.975} * 100$$

Entonces: C.V. = 0.144738

El límite máximo aceptado para métodos analíticos es de un 3%. Como 0.1447 es menor a 3.0 se acepta H_0 , por lo que el método resulta repetible.

4.1.5.2) Reproducibilidad.

Esta se evalúa mediante un análisis de varianza y los datos empleados son los siguientes:

	Analista 1	Analista 2	
Día 1	Y11.=502.58	Y21.=500.65	Y.1.=1003.23
Día 2	Y12.=501.52	Y22.=499.97	Y.2.=1001.49

	Y1..=1004.10	Y2..=1000.62	Y...=2004.72
	$Y = \frac{2}{(2004.72)} = 401902.278$		

$$i=1.....2=a$$

$$j=1.....2=b$$

$$k=1.....5=c$$

$$EY_{i..} = (1004.10)^2 + (1000.62)^2 = 2009457.194$$

$$\frac{EY_{i..}^2}{2*5} = 200945.7194$$

$$\frac{Y_{...}^2}{2*2*5} = \frac{4018902.278}{20} = 200945.1139$$

$$EY_{.j.} = (1003.23)^2 + (1001.49)^2 = 2009452.653$$

$$\frac{EY_{.j.}^2}{2*5} = 200945.2653$$

$$EY_{ij.} = (502.58)^2 + (501.52)^2 + (500.65)^2 + (499.97)^2$$

$$EY_{ij.} = 1004729.39$$

$$\frac{EY_{ij.}^2}{c} = \frac{1004729.39}{5} = 200945.878$$

$$EY_{ijk} = 200947.7548$$

El análisis de varianza que se practicó se muestra en la Tabla XIX:

Tabla XIX. Análisis de Varianza para evaluar la reproducibilidad del método que ocupa el reactivo DNS.

TABLA DE ANADÉVA

Fuente de variación	grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Fcalc.	Ftablas
Analista	i-1 2-1=1	0.6055	0.6055	84.09	161.4
Día	j-1 2-1=1	0.1514	0.1514	21.02	161.4
Interacción	1	7.2×10^{-3}	7.2×10^{-3}	0.0613	4.49
Error	16	1.8768	0.1173	-----	-----

Como en los tres casos (analista, día e interacción) Fcalc es menor que F de tablas, se acepta H_0 y el método es reproducible.

4.2. Discusión.

En vista de que diversos trabajos publicados donde se cuantificaron azúcares reductores con reactivo DNS, señalaron la presencia de comportamientos extraños al utilizarlo, fue necesario realizar la prevalidación del mismo siguiendo los criterios establecidos por las Buenas Prácticas de Manufactura y de Laboratorio así como aquellos propuestos por diversos comités

oficiales. En base a los resultados obtenidos, este método cumplió satisfactoriamente con todos los parámetros considerados y demostró ser aplicable a las muestras de interés. Cabe señalarse que, las concentraciones aquí estudiadas se tomaron de acuerdo con los intervalos manejados en fermentaciones hechas rutinariamente en nuestro laboratorio al igual que los analistas 1 y 2 fueron compañeros elegidos por trabajar desde al menos 6 meses con este método analítico.

Se consideran los estudios aquí hechos como prevalidatorios dado que se determinaron sólo algunos de los parámetros mínimos que una validación exige. Sin embargo, lo hecho aquí sirve como punto de referencia para subsiguientes investigaciones. Es de destacarse también que en la literatura se reportan otros parámetros estadísticos distintos a los aquí empleados e incluso diferentes ecuaciones matemáticas para el mismo parámetro estadístico pero se han utilizado los que son reconocidos por diversos comités oficiales de validación.

La aceptación de la importancia que la validación reviste ha sido poca dentro del ámbito biotecnológico a nivel investigación. Afortunadamente otros grupos multidisciplinarios de investigación, dentro de las áreas biomédica y física experimental en nuevos materiales, se han mostrado más sensitivos en este sentido y actualmente ya incluyen la validación de métodos analíticos en algunas de sus técnicas de rutina. Lo anterior alienta para continuar decididamente los esfuerzos hasta hoy emprendidos (Hernández, Macouzet, Bolaños y Piña, 1991; Hernández, Macouzet y Bolaños, 1991).

5. Aplicación del método del DNS en Procesos Biotecnológicos.

5.1. En medios de fermentación para el cultivo de hongos filamentosos.

Introducción.

El ácido cítrico tiene una amplia gama de aplicaciones, que van desde sus usos como antioxidante, saborizante, acidulante, y agente quelante, hasta su empleo farmacéutico en transfusiones sanguíneas. Se han reportado como productores de ácido cítrico varios hongos filamentosos, entre los más importantes: *Aspergillus niger*, *A. clavatus*, *A. wentii*, *Penicillium luteum*, *P. citrinum*, *Mucor pyriformis* y *Ustilinia vulgaris*. En la biosíntesis de este ácido por los microorganismos anteriores, están implicadas las vías metabólicas de Embden-Meyerhof-Parnas y de la Hexosa monofosfato. La Acetilcoenzima A proveniente de estas vías se condensa con oxalacetato (que está presente en el Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos) y forma así ácido cítrico. El Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos puede ser frenado en la formación de ácido cítrico por inhibición de las enzimas cis-aconitasa e isocitrato deshidrogenasa (Winskill, 1983; Kubicek, 1988), por presencia de peróxido de hidrógeno, iones cobre o mediante la acción de B-hemolinas (Peppler y Perlman, 1979). Las enzimas intracelulares que participan en la producción del ácido cítrico se conocen apenas, por lo que su localización y actividad son objeto de intensos estudios actualmente (Bercovitz, et al., 1990; Jaklitsch, Kubicek y Scrutton, 1991a; 1991b).

El comportamiento encontrado durante la fermentación de hongos filamentosos productores de ácido cítrico se muestra en la Gráfica 19.

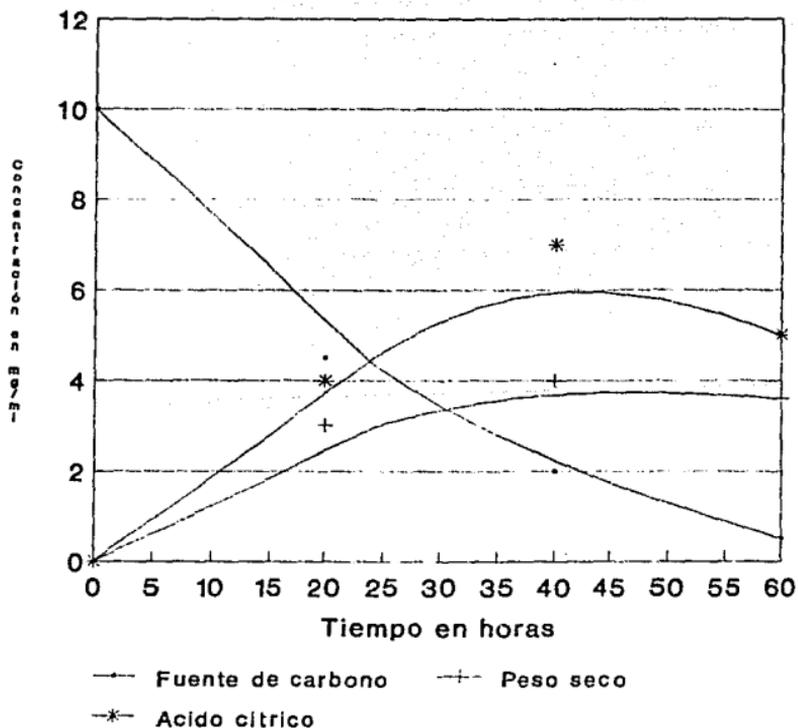
5.2. En medios de fermentación para el cultivo de bacterias recombinantes.

Introducción.

La enzima penicilino-amidasa posee una gran importancia pues el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) es la materia prima para obtener gran cantidad y variedad de penicilinas semisintéticas y se produce a gran escala por el método químico y por el enzimático mediante la separación de la cadena lateral de las penicilinas G o V. La enzima que lleva a cabo esta reacción se conoce con diversos nombres, como penicilin-acilasa, penicilino-amidasa, penamidasa, pero su nomenclatura oficial es EC 3.5.1.11. Esta enzima es abundante en la naturaleza. Fue descubierta por Sakaguchi y Murao (1959) quienes la encontraron en *Penicillium chrysogenum* y hasta hoy se ha encontrado en bacterias, mohos, levaduras, actinomicetos e incluso en plantas y animales (Giral y Quintero, 1987).

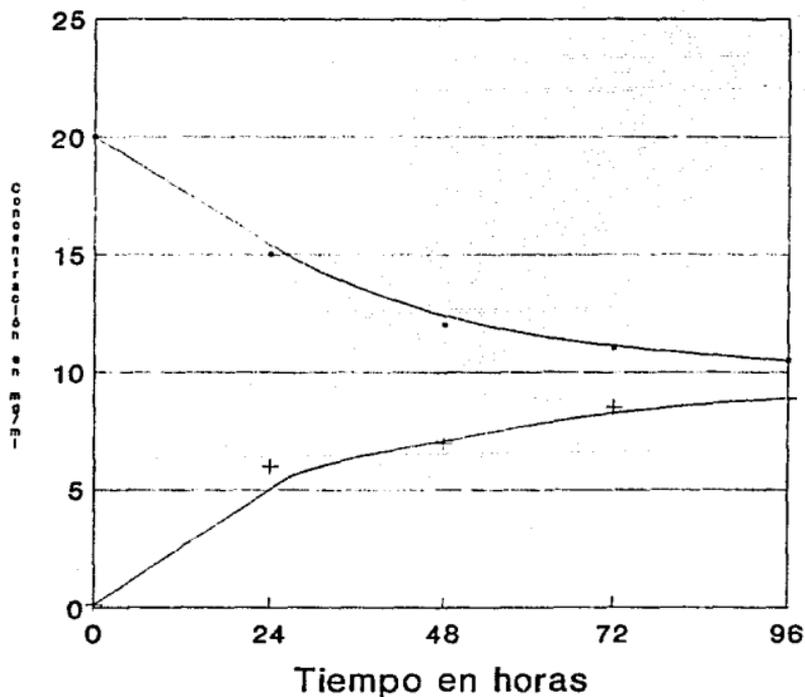
Los resultados obtenidos en la fermentación de *E. coli* FMG 10 son mostrados en la Gráfica 20.

Gráfica 19



Parámetros determinados durante la
fermentación de *Aspergillus niger*
productor de ácido cítrico.

Gráfica 20



—●— Fuente de carbono —+— Peso seco

Parámetros determinados durante la
fermentación de *E. coli* recombinante
PMG-10 productora de penicilinoamidasas

5.3. Otras aplicaciones del DNS.

Aparte de sus aplicaciones en la determinación de carbohidratos reductores, se ha reportado el uso del ácido 3,5-dinitrosalicílico para la detección de hongos celulolíticos (Sazci, Erenler y Radford, 1988); en la síntesis y evaluación farmacológica de xantonas como agentes antialérgicos (Harisinghani, Lala y Shridokar, 1989); en la determinación fluorométrica de terbio y disprosio, 1990); en estudios sobre la formación de complejos binarios de Cadmio II (Anjaneyulu y Rao, 1989); en la determinación de parámetros termodinámicos para relajaciones químicas (Citi, Secco y Venturini, 1988); en la inhibición de la biosíntesis del etileno (Leslie y Romani, 1988); en la formación de complejos de Zinc y Cobalto con derivados sustituidos de ácido salicílico (Diebler y Secco, 1989); en el estudio de potenciales de ionización y afinidades electrónicas de moléculas orgánicas (Gaber y Abd-El, 1989); en el estudio de relaciones estructura-actividad para agentes antimicrobianos (Khadikar, 1986), por sólo citar algunas.

DISCUSION DE RESULTADOS

Con el calor de su piel
y el fuego de su aliento
Sopla con fuerza,
sopla profundamente
en la boca de la muerte.
Ardiendo, ardiendo.
con el beso de la vida.

(El beso de la vida)

Peter Gabriel, 1986.

DISCUSION GENERAL DE RESULTADOS

A pesar de que los métodos colorimétricos evaluados experimentalmente fueron elegidos porque se partió de la hipótesis que podían aplicarse en el análisis de las muestras de interés, los resultados mostraron que dos de ellos presentan interferencias. Los métodos A (determinación con ácido sulfúrico-fenol) y C (determinación con reactivo del ferricianuro) no fueron específicos para azúcares reductores y dado que las interferencias fueron luego detectadas en algunos sustratos muy empleados como fuentes de carbono y/o nitrógeno en fermentaciones, se dirigió la atención hacia los dos métodos colorimétricos restantes: método B, determinación con 2-bifenilamina y método D, determinación con reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico. El método B presenta un grave inconveniente: se requiere del manejo de un reactivo químico en extremo tóxico. Existen también otras desventajas, como el bajo grado de pureza con que se encuentra comercialmente y el hecho de que no es un reactivo muy utilizado, siendo necesaria su importación pues nadie en el país lo elabora. Por estas razones se evaluó más en detalle el método D. Este método ya se ha reportado para la determinación de azúcares reductores en medios de fermentación. Sin embargo, también se han reportado comportamientos inesperados cuando es utilizado en, por ejemplo, cultivo de hongos filamentosos en fermentaciones. Según una extensa revisión hecha (que incluyó la consulta a bancos de datos en información sobre química, biología, medicina, bioingeniería y física) existe poca información en la literatura científica acerca de estudios realizados al método cuando se aplica a la cuantificación de azúcares reductores.

En los últimos años sólo se encuentran reportes donde se estudió este método para fines muy distintos, los cuales ya fueron mencionados.

Durante la evaluación de algunos de los factores que afectan la determinación de azúcares reductores al utilizar el reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico, destaca el efecto de la temperatura. Aquí se demostró que la temperatura a la cual se prepara el reactivo no influye sobre la intensidad del color final que éste presenta, pero sí afecta en el porcentaje de reductores que llegan a cuantificarse. La variación encontrada corresponde a un +/- 25%. Los experimentos, como ya también se ha indicado, fueron hechos al menos por triplicado. Aquí se efectuaron en cuatro ocasiones y se cuidó de mantener la independencia entre los datos. En todas las ocasiones se encontró este mismo comportamiento. Sin embargo, no quedan muy claras las razones de esto. Quizá este fenómeno esté asociado con la cantidad de oxígeno disuelto presente en el reactivo. La cantidad de este elemento en la disolución puede disminuirse calentando el reactivo pero entonces cabría esperar que las mejores cuantificaciones se logaran cuando el reactivo se prepara a 70°C y no a 50, como aquí ocurrió. Un hecho también interesante es que conforme se aumenta la temperatura a la cual se prepara el reactivo también se incrementa la cantidad de azúcares reductores que llegan a cuantificarse.

Cuando se evaluó el efecto que la concentración de los diversos componentes tienen sobre la determinación de azúcares reductores, fueron consideradas como las cantidades más adecuadas

aquellas que al emplearlas no modifican el comportamiento lineal que el método sigue. Esto es muy importante de destacar pues de no cumplirse se presenta una muy baja correlación entre datos, con los consiguientes errores en las cantidades así determinadas. Las concentraciones encontradas como las más adecuadas no difieren en más de un 20% de las hasta entonces consideradas en nuestro laboratorio, por lo que este factor no debe ser la causa principal de las anomalías encontradas en algunos trabajos de investigación reportados. Un último factor aquí estudiado fue la estabilidad del color desarrollado luego de efectuada la reacción, encontrando que dicha coloración se mantiene constante al menos por 20 horas, lo que representa una gran ventaja cuando se trabajan gran número de muestras a la vez. No fue calculado el valor que tiene el coeficiente molar de extinción pero puede ser esta una referencia útil para establecer el grado de estabilidad del color formado en términos cuantitativos.

Una vez estudiados los factores mencionados, se efectuó la optimización del método del DNS utilizando el conocido método de Box-Wilson. Mediante este procedimiento matemático-estadístico se evaluaron las variables volumen de reactivo, tiempo de reacción y tiempo de reposo antes de leer. Al igual que en el estudio anterior de las concentraciones de los componentes en el reactivo, los valores encontrados como óptimos no difieren grandemente de los hasta hoy empleados. Sin embargo, fue importante hacer uso de un procedimiento matemático que confirmara lo apropiado de las condiciones que se han venido utilizando.

Una vez optimizado el método este fue prevalidado. La

validación de métodos analíticos se usa desde hace tiempo en la Industria Farmacéutica pero los biotecnólogos conocen poco esta valiosa herramienta. En Ingeniería Química se utiliza un procedimiento conocido como algoritmo de Yates, el cual es útil para calcular efectos de variables y sus interacciones (y por lo tanto útil para evaluar, por ejemplo, la reproducibilidad del método). Sin embargo, este procedimiento involucra muchos cálculos y maneja un número limitado de variables a la vez, por lo que no resulta práctico aplicarlo aquí en sustitución de los parámetros estadísticos ya descritos.

Finalmente, el método del DNS se aplicó a la determinación de azúcares reductores en estudios hechos sobre la producción de ácido cítrico por hongos filamentosos y de enzima penicilinoamidasas por una bacteria (*E. coli*) recombinante; ambos microorganismos fueron crecidos en cultivos sumergidos de tipo lote. Según los resultados obtenidos (mostrados en las Gráficas 19 y 20) este método resultó muy satisfactorio para medir los azúcares reductores adicionados al medio y de esta manera tener una medida indirecta del crecimiento microbiano. Cabe aquí destacar que la determinación de los sustratos consumidos, generalmente carbohidratos y en particular monosacáridos, es un parámetro muy empleado para los fines anteriormente expuestos. De igual manera se ha aplicado en la determinación de actividades enzimáticas para enzimas pectinolíticas y en la producción fermentativa de estreptomycin, pero los datos no se han mostrado aquí, principalmente por ser de la autoría de otros grupos de investigación.

CONCLUSIONES

Al cerrar el día
El atardecer esconde
Estas palabras en un juego de sombras
Aquí y ahora
Largo y fuerte
Mi corazón grita
Y el hueso desnudo de un eco dice:
No te alejes.

(El último latido de mi corazón)

Sicouie and the Banshees (1989)

CONCLUSIONES

- Fueron elegidos cuatro métodos colorimétricos, que teóricamente eran posibles de emplear en la determinación de azúcares reductores en medios de fermentación.
- De todos estos métodos, la determinación con ácido sulfúrico-fenol y el que ocupa reactivo del ferricianuro no resultaron específicos para azúcares reductores, por lo que se presentan grandes interferencias cuando se aplican a medios de cultivo que contienen sustratos provenientes de fuentes naturales como son extracto de levadura, agua de cocimiento de maíz, extracto de malta y extracto de carne. El compuesto 2-aminobifenilo es en extremo tóxico, por lo que debe recurrirse al método donde se emplea sólo como último recurso. Este método probó ser específico para los azúcares reductores presentes en los medios de fermentación estudiados. Por todas estas razones se eligió trabajar con el método que ocupa el reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico.
- Fue experimentalmente determinado que la temperatura a la cual se prepara el reactivo no influye sobre su coloración pero sí afecta en el porcentaje de recobro alcanzado. La recuperación de azúcares reductores fue mayor cuando el reactivo se preparó a 50° C. También se demostró que la velocidad de disolución del ácido 3,5-dinitrosalicílico es directamente proporcional a la temperatura y dicha velocidad se expresó en términos cuantitativos.

-En el estudio del efecto que tiene la composición del reactivo sobre la cuantificación de azúcares reductores, se determinaron experimentalmente las concentraciones más adecuadas de cada uno de los componentes presentes en el reactivo. Estas concentraciones no difieren en más de un 20% de las cantidades ya anteriormente propuestas y son: 2.0 % de NaOH; 0.5% de DNS; 0.5% de bisulfito de sodio; 20.0% de tartrato de sodio y potasio y 0.5% de fenol.

-Fue demostrado experimentalmente que el color desarrollado luego de efectuada la reacción es estable al menos por 20 horas.

-El método del DNS fue optimizado utilizando la metodología propuesta por Box y Wilson. Los valores óptimos aquí determinados no difieren mucho de los ya anteriormente propuestos. Sin embargo, tampoco se encontró en la literatura algún trabajo donde a este método analítico se le intentara optimizar. Los valores determinados aquí como óptimos son: un volumen de reactivo igual a un mililitro; 6.77 minutos de tiempo de reacción y 9.0 minutos de tiempo de reposo antes de leer la muestra.

-El método del DNS fue prevalidado y se demostró experimentalmente que resulta específico, lineal, exacto, repetible y reproducible cuando se aplica a la determinación de azúcares reductores en medios de cultivo usados en fermentaciones. Asimismo, se determinó el límite de cuantificación que con él logra alcanzarse. No obstante la importancia que reviste, a resultado lenta su adopción por parte de la comunidad

que realiza investigaciones en Biotecnología; lo contrario ha sucedido con otros grupos de investigadores como por ejemplo los físicos que laboran con nuevos materiales y biomateriales.

- El método que ocupa el reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico puede aplicarse exitosamente para la determinación de azúcares reductores en medios de fermentación para el cultivo de hongos filamentosos productores de ácido cítrico (*Aspergillus niger*) y de bacterias recombinantes (*E. coli* PMG 10) productoras de la enzima penicilino-amidasa.

APENDICES

A1. Composición química de las melazas de caña y remolacha (White, 1948; Forage y Righelato, 1978). Composición en porcentaje.

	M e l a z a s	
	Remolacha	Caña
Peso seco	78.0-85.0	78.0-85.0
Carbohidratos totales	48.0-58.0	50.0-58.0
Nitrógeno	0.2-2.80	0.08-0.50
P O 2 5	0.01-0.02	0.009-0.07
CaO	0.15-0.70	0.15-0.80
MgO	0.01-0.10	0.25-0.80
K O 2	2.20-4.50	0.80-2.20
SiO 2	0.10-0.50	0.05-0.30
Al O 2 3	0.005-0.06	0.01-0.04
Fe O 2 3	0.001-0.02	0.001-0.01
Carbono	28.0-34.0	28.0-33.0
Cenizas	4.0-8.0	3.5-7.5

A2. Monosacáidos y oligosacáidos en cebada utilizada como sustrato en fermentaciones (Ratlidge, 1977).

Carbohidrato	Peso seco mg/g
Glucosa	0.20-0.93
Fructosa	0.33-1.59
Maltosa	0.00-1.35
Sacarosa	3.43-16.90
Rafinosa	1.44-8.32
Cetosa	0.70-4.33
Fructosanas	
Solubles en etanol	0.97-5.36
Solubles en agua	0.40-9.00

A3. Composición del extracto de malta en polvo (Sikyta, 1982). Valores en porcentaje peso/peso.

Componente	Porcentaje
Maltosa	52.20
Hexosas (glucosa y fructosa)	19.10
Sacarosa	1.80
Dextrina	15.00
Otros carbohidratos	3.80
Proteínas	4.60
Cenizas	1.50

A4. Composición química promedio del licor de maíz (Liggett y Koffler, 1948). Valores en porcentaje peso/peso.

Componente	Porcentaje
-----	-----
Agua	45.0-55.0
Nitrógeno total	2.7-4.50
Nitrógeno orgánico	1.0-1.80
Sustancias reductoras	0.1-11.0
Acido láctico	5.0-15.0
Cenizas	9.0-10.0
Acidos volátiles	0.1-0.30
Dióxido de azufre	0.009-0.015
Calcio	0.5-1.50
Cobre	0.0-0.001
Fierro	0.01-0.05
Magnesio	0.05-1.00
Manganeso	0.004
Fósforo	2.0-3.00
Potasio	1.0-2.00
Azufre	0.340
Zinc	0.050

A5. Composición química promedio del licor de papa.
Valores en porcentaje peso/peso (Dimling, 1978).

Componente	Porcentaje
Peso seco	72.70
Nitrógeno Total	5.00
Nitrógeno amoniacal	1.90
Sustancias reductoras	27.50
Acido láctico	5.00
Cenizas	20.80

A6. Composición química promedio del extracto de salvado utilizado en fermentaciones (Zelinka, 1960). Valores en porcentaje peso/volumen.

----- Componente -----	----- Porcentaje p/v -----
Peso seco	70.00
Nitrógeno total	4.60
Nitrógeno amoniacal	2.00
Sustancias reductoras	19.20
Carbohidratos no reductores	4.20
Carbohidratos totales	23.40

A7. Composición química promedio del extracto de levadura utilizado en fermentaciones (Bridson y Brecker, 1970).

Componente	Concentración en mg/g
Nitrógeno total	75.0-105.0
Nitrógeno amoniacal	34.0-48.0
Cloruros (como NaCl)	0.70-1.30
Peso seco	300
Fosfatos como P ₂ O ₅	38
Carbohidratos	82
Sodio	56
Potasio	30
Calcio	0.10
Fierro	0.050
Magnesio	2.0
Cobre	0.050
Zinc	0.050
Manganeso	0.0050
Cobalto	0.0050

A8. Contenido de vitaminas en algunos sustratos empleados en fermentaciones (Solomons, 1969).

Vitamina (ug/g)	Harina de maiz	Harina de soya	Melazas de caña	Extracto de levadura
Tiamina	4.50	13.50	0.80	10.00
Riboflavina	0.90	3.50	---	20.00
Acido nicotínico	23.00	25.20	15.00	400.00
Acido Pantoténico	4.60	26.10	20.00	50.00
Piridoxina	6.90	8.50	----	1.00
Biotina	0.10	0.70	1.50	0.30
Inositol	----	3850.0	2000.0	1500.0
Colina	----	2880.0	----	1500.0

A9. Método de Saffran-Demstedt para la determinación de ácido cítrico.

1. A un mililitro de medio filtrado se le adicionan ocho mililitros de anhídrido acético en un tubo de ensaye.
2. Colocar luego el tubo en un baño de agua a 60 °C durante diez minutos.
3. Agregar ahora un mililitro de piridina y volver a colocar el tubo en baño de agua por cuarenta minutos más.
4. Enfriar por cinco minutos a temperatura ambiente.
5. Leer luego a 400-420 nm. Hacer un blanco de reactivo tratando un mililitro de agua de la misma forma que a la muestra.

A10. Extracción de enzimas intracelulares (penicilino-amidasas) por choque osmótico en células de Escherichia coli recombinante PMG 10.

Procedimiento.

1. La enzima se extrae por choque osmótico de un paquete de células húmedas de Escherichia coli PMG 10 resuspendido en 20 ml de buffer de fosfato de potasio (0.033 M, pH 7.0) por cada gramo de células húmedas.
2. Por cada ml de suspensión celular se adicionan 0.15 ml de solución de EDTA al 9.37% p/v (sal disódica, pH 8.0 ajustando con NaOH 1N) y 0.85 ml de sacarosa al 50% p/v.
3. Al cabo de 10 min. de agitación suave la suspensión se centrifuga 15 min. a 10,000 rpm.
4. El paquete celular se resuspende nuevamente (con agitación vigorosa) en 8 ml de agua destilada por cada gramo de paquete inicial de células.
5. Después de agitar la suspensión se le practican los análisis de actividad enzimática (método de p-dimetilaminobenzaldehído) y de concentración de proteínas (método de Bradford) de muestras de:
 - a) Células resuspendidas en buffer de fosfatos.
 - b) Sobrenadante de la suspensión de sacarosa.
 - c) Sobrenadante de la suspensión de agua.
 - d) Células tratadas y resuspendidas en agua al volumen

inicial.

A11. Microdeterminación de actividad enzimática de penicilino-amidasa por el método del p-dimetilaminobenzaldehído.

PABA. Disolver 1.0 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 50.0 ml de alcohol etílico al 60 v/v, agregar 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado y llevar a un volumen final de 100.0 ml con alcohol etílico al 60% v/v. Mantener el reactivo en oscuridad.

Buffer de fosfatos. 0.1 M, pH 7.8.

Lisozina. 10 mg/ml en H₂O. Mantenerla en congelación.

Penicilina. Penicilina G-K, 200mg/ml en H₂O. Mantenerla en refrigeración.

Procedimiento.

- 1) Centrifugar 1.0 ml del crecimiento celular 5 min. a 14000 rpm. Desechar el sobrenadante.
- 2) Resuspender el paquete celular en 900 μ l de Buffer de fosfatos.
- 3) Agregar 5 μ l de la solución de lisozima e incubar 10 min. a 37 C.

- 4) Agregar 100 μ l de la solución de penicilina e incubar 10 min a 37°C.
- 5) Colocar una alícuota de 100 μ l de la muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, agregar 775 μ l de alcohol etílico al 60% v/v y 125 μ l de PABA. Incubar 10 min a 37°C. Correr al mismo tiempo un blanco con los mismos reactivos.
- 6) Centrifugar 1 min. a 14.000 rpm.
- 7) Leer la absorbancia del sobrenadante contra el blanco a una longitud de onda de 415 nm.

A12. Cuantificación de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976; Scopes, 1982).

Preparación del reactivo:

- a) Disolver 100 mg de Azul brillante de Cumasina G-250 con agitación vigorosa, en 50 ml de etanol al 95% y luego mezclar con 100 ml de ácido fosfórico al 85%.

La mezcla se diluye a un litro con agua y se filtra para eliminar lo insoluble. Esta solución es estable por 1-2 semanas.

Una variante que puede también utilizarse es la siguiente:

- b) Se disuelven 60 mg de Azul brillante de Cumasina G-250 en un litro de ácido perclórico al 3% y se filtra para eliminar los restos insolubles. La absorbancia a 465 nm debe ser de 1.3-1.5. Esta solución es estable indefinidamente.

Procedimiento:

A una muestra de 1.5 ml conteniendo más de 50 ug de proteína, se le añaden 1.5 ml del reactivo de Azul Cumasina y se lee la absorbancia a 595 nm después de 2-30 minutos. Para el trabajo con soluciones concentradas de proteína (75 mg/ml) es conveniente tomar 1.5 ml de agua o solución diluida de cloruro sódico. Una vez mezclada con la muestra esta solución, se adiciona el reactivo colorido. La solución concentrada de proteína se precipitará al contacto con el colorante.

A13. Método para determinar la concentración celular (Shewale, Kumar y Ambekar, 1987).

Procedimiento:

1. Colocar un mililitro de la muestra proveniente de la fermentación en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2. Centrifugar la muestra 5 minutos a 13,000 rpm en una microcentrifuga. Desechar el sobrenadante.
3. Resuspender el paquete celular en un mililitro de agua destilada.
4. Hacer una dilución 1:5 de la muestra usando agua destilada.
5. Leer la absorbancia de la muestra contra un blanco de agua destilada a una longitud de onda de 525 nm.

A14. Aislamiento y purificación a pequeña escala de ADN plasmídico (Gucry, Le blanc y Falkow, 1973).

Cosecha.

1. Transferir un mililitro del cultivo de distintos tiempos de fermentación a un tubo de microcentrifuga. Centrifugar a 12,000 rpm por cuatro minutos.
2. Retirar el sobrenadante por aspiración, dejando el paquete celular tan seco como sea posible.

Lisis Alcalina.

1. Resuspender el paquete celular anterior en 100 μ l de la solución I fría empleando un homogeneizador vórtex.

Solución I:

Glucosa 50 mM
Tris.Cl (pH 8.0) 25 mM
EDTA (pH 8.0) 10 mM

La solución I puede prepararse en lotes de aprox. 100 ml, esterilizados en autoclave por 15 minutos a 10 lb/pg y mantenidos a 4°C.

2. Adicionar 200 μ l de la Solución II recientemente preparada.

Solución II:

NaOH 0.2 N (diluida de una solución concentrada 10 N)
SDS al 1.0 %

Cerrar el tubo perfectamente y mezclar el contenido invirtiendo el tubo rápidamente por cinco veces. Asegurarse de que toda la superficie del tubo esté en contacto con la solución II. No utilizar aquí el vórtex. Mantener el tubo en hielo.

3. Adicionar 150 μ l de la Solución III fría.

Solución III:

acetato de potasio 5 M	60 ml
ácido acético glacial	11.5 ml
agua destilada	28.5 ml

La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

Cerrar el tubo perfectamente y mezclar invirtiendo suavemente por 10 seg para dispersar la solución III en el lisado celular. Mantener el tubo en hielo por 3-5 minutos.

4. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm en una microcentrifuga. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

5. Adicionar un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25: 24: 1). Mezclar invirtiendo el tubo.

Después centrifugar por 2 minutos a 12,000 rpm en una microcentrifuga y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Lavar con un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y repetir el procedimiento.

6. Precipitar el ADN de doble cadena con un volumen de alcohol isobutilico a temperatura ambiente. Mezclar invirtiendo el tubo. Permitir a la mezcla reposar por 2 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar por 5 minutos a 12,000 rpm en una microcentrifuga.
8. Eliminar el sobrenadante por aspiración suave. Dejar el tubo en una posición invertida sobre una toalla de papel para permitir que todo el fluido drene. Eliminar cualquier gota del fluido adherido a las paredes del tubo.
9. Lavar la pastilla del ADN de doble cadena con un mililitro de etanol al 70% a 4°C. Eliminar el sobrenadante como se describió en el paso 8 y permitir que la pastilla seque al aire por 10 minutos.
10. Redisolver el ácido nucleico en 50 μ l de TE (pH 8.0) que contenga ARNasa pancreática libre de ADNasa (20 μ g/ml). Mezclar suavemente invirtiendo el tubo. Guardar el ADN a -20°C.

11. Realizar la determinación electroforética del plásmido en un gel de agarosa al 1.0% en buffer TAE 1X. Utilizar el Buffer TAE 1X como buffer de corrida. Correr la electroforesis a 100 V. Revelar con una solución de bromuro de etidio ($4 \mu\text{g/ml}$) y observar bajo una lámpara de luz ultravioleta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a la participación de las siguientes personas: Ma. de los Angeles López de Susarrey y Claudia S. García Palacios (secretarias), Román González y Celaya, Luis Ríos Lobato y Leopoldo Mora Castela (personal de de la Planta Piloto) todos ellos del Depto. de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM quienes siempre me brindaron su incondicional ayuda en el tiempo que allí trabajé: al Biólogo y amigo Gerardo Hernández Medina y la Dra. Ma. Cristina Piña del Depto. Polímeros del Instituto de Investigación en Materiales por aceptar mis sugerencias respecto a la validación de métodos analíticos; a Juan Carlos Pérez P. miembro del grupo CAAP por todas las facilidades y asesoría en el manejo de paquetes de informática; a Catita y Abelardo de la Biblioteca Jesús Romo Armería del Instituto de Química por permitirme el libre acceso al acervo bibliográfico; a la Maestra Magdalena Martínez Rodríguez y al Lic. Erasto Brito Brito responsables de la Biblioteca en el Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM por su ayuda en la adquisición de material bibliográfico, uso de CD-ROM y consulta a los bancos de datos DIALOG y ORBIT; a los Doctores Rodolfo Quintero Ramírez, Jefe del Depto. de Bioingeniería y Jesús Martín Polo, ambos del Instituto de Biotecnología-UNAM y al QFB Agustín Reyó Herrera del Depto. de Alimentos y Biotecnología de la Fac. Química-UNAM por la revisión crítica y las sugerencias hechas; al Dr. Fernando Ulises Adame de la Universidad Antonio Narro por el entrenamiento en técnicas de Biología Molecular; a los Dres. Maynard V. Olson de la Escuela de Medicina, Universidad de Washington; Antonio Moreira, Jefe del Depto. de Ingeniería Química y Bioingeniería de la Universidad de Maryland e I.W. Sutherland de la Universidad de Edimburgo por sus comentarios, recomendaciones y la valiosa información que me facilitaron. A la Organización de las Naciones Unidas por la beca concedida para asistir al curso Avanzado sobre Procesos Biotecnológicos. De manera especial a: QFB Felipe A. Pérez Vega, jefe de la carrera de QFB; QFB Patricia Parra Cervantes de la Secretaría Técnica de esta carrera y a QFB Domitila Burgos Jara, coordinadora del ciclo terminal por su gran apoyo y comprensión a la QFB y entrañable amiga Lucía Cornejo Barrera, asesora de este trabajo. A mis maestras QFB Mirna Irene Flores Galaz y Rocío Flores (Teatro del Cuerpo) por las innumerables enseñanzas y los consejos de siempre. A las Dras. María Elena Mellado Rojas del Lab. Biotecnología Vegetal, ENEP Zaragoza, Campus II por sus críticas tan acertadas y Carmen Giral Barnés por todo su apoyo. Finalmente, a todos y cada uno de los miembros del jurado por su valiosa ayuda e infinita paciencia.

REFERENCIAS

Así como de los viejos campos ve el hombre,
año tras año, venir el nuevo trigo,
del mismo modo, de los viejos libros,
viene toda esta nueva ciencia
para que el hombre aprenda.

Geoffrey Chaucer (1340-1400).

¿Dónde está el conocimiento que hemos perdido
en la información?"

Thomas Stearns Eliot (1888-1965)

REFERENCIAS

1. Aiba, S. 1984. Biotechnology. New or Old? J. Chem. Technol. Biotechnol. 34B, 229-231.
2. Alberts, Bruce., Bray, Dennis., Lewis, Julian., Raff, Martin, Roberts, Keith and Watson, D. James. 1989. Molecular Biology of the Cell. 2nd. ed. Garland Publishing Inc. USA.
3. Aldrich. 1991. Catalog Handbook of Fine Chemicals 1991-92. Aldrich Chemical Company Inc. p.545.
4. Angyal, J. Stephen. 1990. Complexing of carbohydrates with copper ions: a reap praisal. Carbohydrate Research 200, 180-181.
5. Anjaneyulu, Y., and Rao, R. P. 1989. Studies on the formation equilibria of binary complexes of Cadmium (II) with various salicylic acids. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. Part A, 55 (4), 683-685.
6. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of AOAC. Hilrich, Kenneth, editor. US. Assoc. of Official Analytical Methods. The William Byrd Press. USA.
7. Atkinson. B., and Mavituna, F. 1983. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. Macmillan Publishing Co. London.
8. Becker, M. J., Caldwell, A. Guy., and Zachgo, E. A. 1990. Biotechnology-A Laboratory Course. Chapter 5. Academic Press. Inc. USA.

9. Bell. D. J., Manners, D. J., and Palmer, A. 1952. J. Chem. Soc., 3760.
10. Bercovitz, A., Peleg, Y., Battat, E., Rokem, J. S., and Goldberg, I. 1990. Localisation of pyruvate carboxylase in organic acid-producing *Aspergillus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1594-1597.
11. Best, D.J. 1985. Chemistry and Biotechnology. Chapter 4 in Biotechnology, principles and applications. Higgins, I.J. editor. Blackwell Scientific Publications. Great Britain.
12. Bolaños, V.M., Mota, D., Saval, S., y Reyo, A. 1991. Aislamiento de hongos productores de naringinasa. XXII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 23-28 Septiembre, Guadalajara, Jalisco.
13. Bolaños, V. Martín y Cornejo, Lucía. 1992. 150 años del método de Fehling. Tópicos de Investigación y Posgrado. ENEP Zaragoza, UNAM. Vol. IV, No. 3. Aceptado para su publicación.
14. Bolaños García Víctor Martín y Reyo Herrera Agustín. 1992. Obtención de intermediarios para compuestos empleados en diagnóstico médico mediante síntesis química-bioconversión de esteroides. V Congreso Nacional Estudiantil de Investigación en Salud. México, D.F. 15-17 de Enero.
15. Box, G.E.P., and Wilson, K.B. 1951. J. Royal Stat. Soc. B13.1.
16. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the

- principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
17. Bridersen, R., and Ricketts, H.T. 1949. J. Lab. Clin. Med. 34:1447.
 18. Bridson, E.Y., and Brecker, A. 1970. Design and Formulation of Microbial Culture Media. in Methods in Microbiology. Vol. 3A. Norris, J.R., and Ribbons, D.W. editors. Academic Press. New York.
 19. Brown, L.T., and Le May, H.E. Jr. 1988. Chemistry, the Central Science. 4th. ed. Prentice Hall. USA.
 20. Campbell, M.K. 1991. Biochemistry. Saunders College Publishing. USA.
 21. Campos, M.A. 1991. Problemática cultural de la Ciencia. Sociológica, 6 (16). 11-25.
 22. Candy, D.J. 1980. Biological Functions of Carbohydrates. Blackie & son Limited. Scotland. UK.
 23. Castellan, W. Gilbert. 1987. Fisicoquímica. Addison-Wesley-Iberoamericana. Mexico.
 24. Christian, D. Gary. 1986. Analytical Chemistry. 4th. ed. John Wiley & sons. Hong Kong.
 25. Citi, Moreno., Secco, Fernando., and Venturini, Marcela. 1988. Dynamic method of analysis: evaluation of thermodynamic parameters from the amplitudes of chemical relaxation. J. Phys. Chem. 92 (22). 6399-6404.

26. Comisión Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura. 1989. Guía de Procedimientos Adecuados de Laboratorio Analítico. México.
27. Crueger. Wulf y Crueger. Anneliese. 1984. Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. Brock, D.T. (ed.). Sinauer Associates, Inc. USA.
28. Dale. E. Bruce.. and Linden. C. James. 1984. Fermentation substrates and Economics. in Annula Reports on Fermentation Process. Tsao, G.T. editor. Vol. 7. Academic Press Inc. USA.
29. Daniel. W. Wayne. 1980. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa. México.
30. Da Silva, E.J., Dommergues, Y.R., Nyns, E.J., and Ratledge, C. 1987. Microbial Technology in the Developing World. Oxford University Press. Great Britain.
31. Davis. D.B., Dulbecco. R., Eisen. H., and Ginsberg, H. 1990. Microbiology. Fourth edition. J.B. Lippincott Co. USA.
32. Demain. A.L. 1972. Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites. J. Appl. Chem. Biotechnol. 22. 345-362.
33. Diebler, H., and Secco. F. 1989. Effects of intramolecular hydrogen bonding on the rates of complex formation of cobalt II and zinc II with substituted salicylic acids. J. Phys. Chem. 93 (5). 1691-1694.

34. Dimling, W. 1978. Rohstoffe für Fermentationen. Starch. Stärke 30: 401-408.
35. Dubois, M., Guilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A., and Smith, F. 1951. Nature 168, 167.
36. Dubois, M., Guilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28, 350-356.
37. Dunn, G.M. 1985. Nutritional requirements of microorganisms. in Comprehensive Biotechnology, Moo-Young, M. editor. Vol 1. Pergamon Press, Great Britain, UK.
38. Dunsmore, A., Mellet, P., and Wolff, M. 1980. Some factors affecting the Lane-Eynon titration method for determining reducing sugars in sugar products. Chemical Abstracts 93, 222181u.
39. Du Praw, J. Ernest. 1971. Biología Celular y Molecular. Ed. Omega., Barcelona, España.
40. Ertola, R. J. 1985. The Importance of Considering Biotechnology as an Integrated Multidisciplinary Discipline. J. Chem. Technol. Biotechnol. 35B, 76-77.
41. Fassatiová, Olga. 1986. Progress in industrial microbiology. Vol. 22. Elsevier Science Publishing. Czechoslovakia.
42. Fehling. 1849. Ann. 72: 186.
43. Forage, A.J., and Righelato, R.C. 1978. Microbial protein from

- carbohydrate wastes. Progress Ind. Microbiol. 14, 59-94.
44. Gaber, M., and Abd-El-Ghafer. 1989. Ionization potential and electron affinities of organic molecules from electronic charge transfer spectra. Chemical Abstracts 111, 6771j.
45. Galeano, Eduardo. 1989. Nosotros decimos no. Ed. Siglo XXI. México.
46. Gaspar, G. 1991. High speed gas chromatography. The theoretical and practical aspects. Journal of Chromatography 557 (1) 331-352.
47. Gerhartz, Wolfgang. 1990. Enzymes in Industry, Production and Applications. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
48. Giral, B. Carmen y Quintero, R. Rodolfo. 1987. Biorreactor enzimático para la producción de intermediarios en la síntesis de antibióticos. en Tecnología Enzimática. aplicaciones en Alimentos y Medicina. Lopez-Munguia, C.A., y Quintero, R. Rodolfo. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
49. Goldstein, Daniel. 1989. Biotecnología, Universidad y Política. Siglo XXI. México.
50. Guerry, P., Le blanc, D.J., and Falkow. S. 1973. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 116: 1064-1066.

51. Guerra, J. 1986. Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories I. Pharm. Technol. March, 74-78.
52. Guía para efectuar prácticas adecuadas de manufactura en la industria farmacéutica. 1983. Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas-Asociación Farmacéutica Mexicana. México.
53. Harisinghani, N.H., Lala, R.G., and Shrirodkar, P.Y. 1989. Synthesis and evaluation of xanthenes as antiallergic agents. Indian Drugs 26 (12). 667-670.
54. Hart, I.F. 1971. Análisis Moderno de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
55. Hawk, L. Gerald. 1979. Biological/ Biomedical Applications of Liquid Chromatography. Marcel Dekker, Inc. USA.
56. Hernández, M. Gerardo., Macouzet, G. Sofia., Bolaños, G. V. Martín., y Piña, B. Cristina. 1991. Grado de citotoxicidad del Oxido de Zinc con ácido poliácrico. XXXIV Congreso Nacional de Física. 21-25 Octubre. México, D.F.
57. Hernández, M. Gerardo., Macouzet, G. Sofia., y Bolaños, G. V. Martín. 1991. Medidas del grado de citotoxicidad en macrófagos y fibroblastos de la aleación zinalco para su posible uso como biomaterial en ortopedia. XXXIV Congreso Nacional de Física. 21-25 de Octubre. México, D.F.
58. Himmelblau, M. David. 1984. Process Analysis by Statistical Methods. Part 2. John Wiley & sons Inc. USA.
59. Hirsch, Allen. 1989. Good Laboratory Practice Regulations.

60. Holland, K.T., Knapp, J. S., and Shoosmith, J.G. 1987. Anaerobic Bacteria. Blackie. Great Britain.
61. Holleman, A.F., und Richter, F. 1961. Lehrbuch der Organischen Chemie. Walter de Gruyter & Co. Berlin.
62. Holloway, B. W. 1988. The Pseudomonas Genome-its analysis and organization in Microbial Metabolism and the Carbon Cycle. Hagerdon, R.S., Hanson, S.R., and Kunz, A.D. editors. Harwood Academic Publishers. USA.
63. Hostettler, F., Borel, F., and Dewel, H. 1951. Helv. Chim. Acta. 34. 2132.
64. Huang, Hanguo., and Gao, Jianwen. 1990. Fluorometric determination of terbium and dysprosium with a salicylic acid derivative-EDTA system. Chem. Abs. 112. 111014h.
65. Hutner, S.H. 1972. Inorganic Nutrition. Ann. Rev. Microbiol. 26. 313-346.
66. Isbell, S. Horace, and Czubarow, Pawel. 1990. Oxidation of carbohydrates by alkaline hydrogen peroxide in the presence and in the absence of ferrous ion. Carbohydrate Research 203. 287-289.
67. Jaklitsch, W.M., Kubicek, C.P., and Scrutton, M.C. 1991a. The subcellular organisation of itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. J. Gen. Microbiol. 137: 533-539.

68. Jaklitsch, W.M., Kubicek, C.P., and Scrutton, M.C. 1991b. Intracellular location of enzymes involved in citrate production by *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 37: 823-827.
69. Jones, Malcolm N. 1979. *Biochemical Thermodynamics*. Jones, M.N., editor. Elsevier Publishing Co. Amsterdam.
70. Joslyn, M. Alexander. 1950. *Methods in food analysis applied to plant products*. Academic Press, New York.
71. Kassart, L., and Dijetska, M. 1978. *Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures*. Elsevier Publishing Co. Amsterdam.
72. Khadikar, P. 1986. Studies on structure-activity relationships: correlations of antimicrobial activity with protonation constants. *Rev. Microbiol.* 17 (4) 291-295.
73. Knorr, D. 1987. *Biotechnological Process in Food Production*. *Food Biotechnol.* 1 (2) 225-248.
74. Koehler, L.H. 1952. *Anal. Chem.* 24: 1572.
75. Kózar, Tibor., Pétrak, Frantisek., and Galová, Zuzana. 1989. RAMM - a new procedure for theoretical conformational analysis of carbohydrates. Presented at EOROCARBV, the 5th. European Symposium on Carbohydrates. August 21-25. Prague, Czechoslovakia.
76. Kubicek, C.P. 1988. The role of citric acid cycle in fungal

- organic acid fermentations. Biochem. Soc. Symp. 54: 113-126.
77. Lane, J.H., and Eynon. L. 1923. Determination of reducing sugars by means of Fehling's solution with methylene blue as internal indicator. J. Am. Chem. Soc. 42, 32T-37.
78. Lehninger, L. Albert. 1990. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2da ed. Ediciones Omega. Barcelona.
79. Lepore, D. Paul. 1979. FDA's Good Laboratory Practice Regulations. Pharmaceutical Technology 3 (6).
80. Leslie. C., and Romani. J. 1988. Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. Plant Physiol. 83 (3) 833-837.
81. Lewis. Benjamin. 1990. GENES IV. Oxford University Press. USA.
82. Ley General de Salud. 1984. Diario Oficial de la Federación. 7 de Febrero.
83. Liggett. R.W., and Koffler. H. 1948. Corn steep Liquor in Microbiology. Bact. Rev. 12: 297-311.
84. Lily. .G. 1965. In The Fungi. Ainsworth, G.C., and Sussman. A.S. editors. Vol. 1. Academic Press. New York.
85. Loewus, A., and Tanner. W. editors. 1982. Plant Carbohydrates. Springer. Berlin.
86. March, Jerry. 1988. Advanced Organic Chemistry. Reactions, mechanisms and structure. 2nd. ed. Saunders College. USA.

87. Maslowska, Joanna, and Bartczak, Ursula. 1988. Enzymic method for organic acid detection on paper chromatography using bacterial alpha-amylase. Chemical Abstracts 109, 221622a.
88. Mc Gilvery, R.W., y Goldstein G. W. 1986. Bioquímica. Aplicaciones prácticas. Ed. Interamericana. México.
89. Mc Neil, B., and Harvey, L.M. 1990. Fermentation, a practical approach. Oxford University Press. England.
90. Merck. Index. 1989. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals. Eleventh edition (Centennial edition). Merck & Co., Inc. Rahway, N.Jersey, USA.
91. Meyer, K.H., van der Wyk, A., and Deng, C. 1954. Helv. Chim. Acta. 37, 1619.
92. Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of reducing sugars. Analytical Chemistry 31: 426-428.
93. Miller, G.L., Blum, R., and Glennon, W.E. Quartermaster Research and Engineering Center, unpublished data, Natick, Massachussets.
94. Moat, G. Albert, and Foster, W. John. 1988. Microbial Physiology. 2nd. ed. John Wiley & sons. USA.
95. Morrison, T.R., and Boyd, R.N. 1987. Organic Chemistry. Fifth edition. Allyn and Bacon Inc. USA.

96. Munson, L.S., and Walker, P.H. 1906. The unification of reducing sugars methods. J. Am. Chem. Soc. 28, 663-686.
97. Murray, K. 1987. Genetic Engineering and its applications, Chapter 10 in Basic Biotechnology. Bullock, J., and Kristiansen, B. editors. Academic Press. Great Britain.
98. Neway, O. Justin. 1989. Process Development of Industrial Organisms. Marcel Dekker Inc. USA.
99. Newcome, G.R., and Faudler, W.W. 1982. Contemporary Heterocyclic Chemistry. John Wiley & sons, Inc. USA.
100. Niiniluoto, I. 1990. Science and epistemic values. Science Studies, vol. 3 (1) 21-26.
101. Paquette, Leo. 1987. Fundamentos de Quimica Heterociclica. Editorial Limusa. México.
102. Payne, J. W. 1980. Microorganisms and Nitrogen Sources. John Wiley & sons, Inc. Chichester.
103. Pepler, H.J., and Perlman, D. 1979. Microbial Technology. Vol I, 2nd. ed. Academic Press. USA.
104. Perlman, D. 1965. The Fungi. Ainsworth, G.C., and Sussman, A.S. editors. Vol. 1. Academic Press. New York.
105. Phillip, J. Regal. 1987. Moving Toward Public Participation in Biotechnology, Chapter 7 in Application of Biotechnology: Environmental and Policy Issues. Fowle, R. John, editor. AAAS Selected Symposium 106. Westriew Press Inc., USA.

106. Pigman, Ward. 1957. The Carbohydrates. Chemistry Biochemistry. Physiology. Academic Press, Inc. USA.
107. Pirt, S.J. 1975. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell. Oxford.
108. Poincaré, Henry. 1952. Science and method. Dover Publishing Inc. New York.
109. Prave, Paul., Fast, Uwe., Sittig, Wolfgang, and Sukatsch, Dieter. 1987. Fundamental of biotechnology VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
110. Quintero, R. Rodolfo. 1985. Prospectiva de la Biotecnología en México. CONACYT-Fundación Javier Barros Sierra. México.
111. Quintero, R. Rodolfo. 1987. Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones. Ed. Alhambra. México.
112. Quisumbing, F. A., and Thomas, A. W. 1921. Conditions affecting the quantitative determination of reducing sugars by Fehling's solution. J. Am. Chem. Soc. 43. 1503-1526.
113. Ratledge, C. 1977. Fermentation substrates. Ann. Report Ferm. Processes. 1 49-71.
114. Rawm, J. David. 1989. Bioquímica. Vol. I. Mc Graw Hill-Interamericana de España.
115. Reznichenko, A.K., and Vasilenko, N.M. 1986. Evaluation of toxicity by DNS reagent. Chemical Abstracts 104. 103778e.

116. Rhem, H.J. 1980. Industrielle Mikrobiologie. 2nd. ed. Springer-Verlag. Berlin.
117. Roehrig, L. Karla. 1984. Carbohydrate Biochemistry and Metabolism. Ed. Westport. Connecticut, USA.
118. Rose, H. Anthony. 1977. Microbiología química: Introducción a la fisiología microbiana. Alhambra, España.
119. Rudd, D.F., and Watson, C.C. 1968. Strategy of Process Engineering. John Wiley & sons, Inc. New York, USA.
120. Sakaguchi, K., and Murao, S.J. 1950. J. Agr. Chem. Soc. 23, 411.
121. Sazci, Ali., Erenler, Kumru, and Radford, Al. 1988. A screening procedure for detecting cellulolytic fungi by using Congo red as internal indicator: a comparative study with the DNS reagent method. Chem. Abs. 109, 3208d.
122. Scopes, K. Robert. 1982. Protein purification, principles and practice. Spring-Verlag. Heidelberg.
123. Serianni, S. Anthony., and Wu, Jian. 1990. Furanose ring anomerization: kinetic and thermodynamic studies of the D-2-pentuloses by spectroscopy of nuclear resonance magnetic-C-¹³. Carb. Res. 206, 1-12.
124. Shalaby, A., el-Shehaby, R., and Aboul-Kheir, A. 1989. Indirect potentiometric titration of reducing carbohydrates I. Using alkaline potassium mercuric bromide solution and

sulphide selective electrode. Acta-Pharm-Hung. 59 (5) 201-204.

125. Shewale. J.G., Kumar. K.K., and Ambekar. G.R. 1987. Evaluation of Determination of 6-aminopenicillanic acid by p-dimethylaminobenzaldehyde. Biotechnology Techniques Vol. 1 (1) 69-72.
126. Silvester, M.R., Bassler. G.C., and Morrill. C.T. 1987. Spectrometric Identification of Organic Compounds. Fourth edition. John Wiley & sons. Inc. USA.
127. Sikyta, B. 1983. Methods in Industrial Microbiology. Ellis Horwood Limited. Czechoslovakia.
128. Solomons, G.L. 1969. Material and Methods in Fermentation. Academic Press. New York.
129. Somogyi. M. 1945. a new reagent for the determination of sugars. Journal of Biological Chemistry, 160.
130. Soumatainer. H., and Oura, E. 1971. in The Yeasts. Rosa. A.H., and Harrison. J.S. editors. Vol. 2. Academic Press. New York.
131. Stainer, R.Y., Ingrham, J.L., Wheelis, M.L., and Page R.P. 1986. The Microbial World. Fifth ed. Prentice-Hall. USA.
132. Streitwieser, Anderw. Jr., y Heathcock. H. Clayton. 1985. Química Orgánica. Nueva Editorial Interamericana. México.
133. Stryer, Lubert. 1990. Bioquímica. 3ra. ed. Tomo I. Editorial Reverté. S.A. España.

134. Sultzki, B.. and Lara A. 1975. determination of reducing sugars. Comparative study of four analytical methods and the influence of some salts that are presents. Rev. CENIC. Cienc. Fis. 6 (2) 13-22.
135. Sumner, J.B. 1921. J. Biol. Chem. 47, 5.
136. Sumner, J.B. 1925. J. Biol. Chem. 62, 287.
137. Sumner, J.B., and Sisler. E.B. 1944. Arch. Biochem. 4. 333.
138. Tempest, D.W. 1969. Quantitative relationships between inorganic cations and anionic polymers in growing bacteria. In Microbial Growth, Society for General Microbiology. Symposium No. 19, ed. Mendow. P.M., and Pirt. S. J., Cambridge University Press. Cambridge.
139. Thomas, W., and Dutcher, B.A. 1924. The colorimetric determination of carbohydrates in plants by the picric acid reduction method. I. The estimation of reducing sugars and sucrose. J. Ann. Chem. Soc. 46: 1663.
140. Timell, T.E., Glaudemans, C.P.J., and Currie, A.L. 1956. Spectrophotometric method for determination of sugars. Analytical Chemistry 28, 350-356.
141. Ting, S.V. 1956. Rapid colorimetric methods for simultaneous determination of total reducing sugars and fructose in citrus juices. J. Agric. Food. Chem. 4. 263-266.

142. Tsao, G.T. 1984. Annual Reports on Fermentation Process. Vol. 7. Academic Press, Inc. USA.
143. Tvaroska, Igor., Kozar, Tibor., and Hricovini, Milos 1990. Oligosaccharides in solution. Conformation analysis by NMR spectroscopy and calculation. ACS Sym. Ser. 430. 162-176.
144. Volfin, Pierre. 1976. Cómo las células almacenan su energía. Capítulo 6 en La Recherche en Biología Molecular. H. Blume ediciones. Madrid.
145. Volk, A.W., and Wheeler, M.F. 1988. Basic Microbiology. Sixth edition. Harper & Row Publishers. USA.
146. Wasserman, B.P., Montville, T.J., and Korwek, E.L. 1988. Food Biotechnology. Food Technology 42 (1) 133-146.
147. Watson, D. James., Hopkins, H. Nancy., Jeffrey, W. Roberts., Steitz, J. Arsetzinger., and Weiner, M. Alan. 1987. Molecular Biology of Gene. Vol. 1. 4th. ed. The Benjamin/Cummins Publishing Co. USA.
148. Weinberg, E.D. 1970. Biosynthesis of secondary metabolites: role of trace metals. Adv. Microb. Physiol. 4. 1-44.
149. White, J. 1948. The Principle and Practice of Yeast Production. Part I. Amer. Brewer 20 : 21-26.
150. White, A., Handler, P., Smith, E., Hill, R, y Lehman, I.R. 1983. Principios de Bioquímica. 6ta. ed. Mc Graw-Hill. España.