

Caracterización de un hidrolizado ácido de caseína

Characterization of a casein acid hydrolysate

Diana Rosa Viera Oramas^I; Raisa Zhurbenko^{II}; Claudio Rodríguez Martínez^{III}

^I Máster en Ciencia y Tecnología de los Procesos Biotecnológicos. Investigadora Agregada. Centro Nacional de Biopreparados. La Habana, Cuba.

^{II} Doctora en Ciencias de los Alimentos. Investigadora Titular. Centro Nacional de Biopreparados. La Habana, Cuba.

^{III} Doctor en Ciencias Técnicas. Investigador Titular. Centro Nacional de Biopreparados. La Habana, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: la mayor disponibilidad de caseína seca en polvo en el mercado y la escasa oferta de caseína húmeda, ocasionaron la factibilidad de modificar el proceso tecnológico de obtención del hidrolizado ácido de caseína.

OBJETIVO: caracterización del hidrolizado ácido de caseína obtenido a escala industrial por una nueva tecnología en el Centro Nacional de Biopreparados (Cuba) y su desempeño en los medios de cultivo.

MÉTODOS: se evaluaron 10 lotes del producto, a los cuales se les realizó el análisis químico, así como la evaluación del desempeño mediante la determinación de la densidad microbiana en el tiempo y la realización de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

RESULTADOS: se demostró que el hidrolizado posee valores de los principales componentes químicos característicos de los productos que se comercializan en el mercado internacional: nitrógeno amínico $6,59 \pm 0,71$ %, nitrógeno total $8,12 \pm 0,41$ % y composición aminoacídica. Como características distintivas el producto muestra un contenido reducido de cloruro de sodio ($32,63 \pm 2,46$ %), calcio (334 mg/L), magnesio (133 mg/L) y pérdida por desecación ($3,34 \pm 0,66$ %). La capacidad de promoción de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 no mostraron diferencia significativa con respecto a hidrolizados proteicos de otros proveedores: Biotécnica International, Merck y Oxoid Ltd. ($p < 0,05$). Se alcanzó un crecimiento bacteriano en el caldo Mueller Hinton a altas diluciones (10^{-6}). Los valores de susceptibilidad de diferentes microorganismos a los antibióticos en el medio agar Mueller Hinton concordaron en relación con los establecidos en las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

CONCLUSIÓN: el producto obtenido puede ser empleado como componente de medios de cultivo con diferentes requerimientos y con adecuada estabilidad.

Palabras clave: hidrolizado, agar Mueller-Hinton, susceptibilidad antimicrobiana.

ABSTRACT

INTRODUCTION: the great availability of dry powdered casein in the market and low accessibility of wet casein induced the viability of modifying the technological process for obtaining casein acid hydrolysate.

OBJECTIVES: to characterize the casein acid hydrolysate obtained at industrial scale by a new technology in the National Center of Biological Products of Cuba and to test its performance in culture media.

METHODS: ten product batches were tested by chemical composition analysis, and their performance was evaluated through measuring the microbial density vs time and conducting susceptibility antimicrobial tests.

RESULTS: it was demonstrated that the hydrolysate had values of the main chemical components inherent to the products in the international market such as amino nitrogen $6,59 \pm 0,71$ %, total nitrogen $8,12 \pm 0,41$ % and aminoacid composition. As distinctive characteristics, the product shows reduced contents of some components like: sodium chloride ($32,63 \pm 2,46$ %), calcium (334 mg/L), magnesium (133 mg/L) and loss on drying ($3,34 \pm 0,66$ %). The growth encouraging capacity for *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 did not show significant differences with protein hydrolysates from other commercial sources, namely Biotecnica International, Merck and Oxoid Ltd. ($p < 0,05$). It appeared bacterial growth in Mueller Hinton's broth at high dilutions (10^{-6}). The antimicrobial susceptibility values in the Mueller Hinton Agar agreed with those established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

CONCLUSIONS: the product may be used as a component of culture media with different requirements and adequate stability.

Key words: hydrolysate, Mueller-Hinton Agar, antimicrobial susceptibility.

INTRODUCCIÓN

El hidrolizado ácido de caseína es una base nutritiva obtenida mediante una hidrólisis no específica con ácido clorhídrico, la cual transcurre hasta convertir la caseína en componentes de una simplicidad química relativa. El ácido clorhídrico actúa sobre las uniones peptídicas y degrada la proteína y polipéptidos a cadenas cortas y aminoácidos. Este hidrolizado se caracteriza por presentar un elevado contenido de nitrógeno amínico y un bajo contenido de aminoácidos sulfurados.¹⁻³

En 1990, un grupo de investigadores del Centro Nacional de Biopreparados (BioCen, Cuba) desarrolló un método de obtención del hidrolizado ácido de caseína a partir de la caseína húmeda, extraída del suero de mantequilla,⁴ sustrato de alto

valor nutritivo, adecuado para la obtención de compuestos con un elevado grado de hidrólisis que aportan nutrientes más asequibles para el metabolismo de los microorganismos.

Los crecientes volúmenes de suero a consumir durante el proceso, unido a la baja disponibilidad de la materia prima, requirieron de una modificación del proceso tecnológico de obtención de hidrolizado ácido, con el empleo como sustrato de la caseína en polvo, en la cual 85 % de la fracción nitrogenada está conformada por proteínas; en mayor proporción se encuentran los aminoácidos leucina, lisina, histidina, ácido glutámico, tirosina, arginina, isoleucina y triptófano.⁵

La nueva tecnología desarrollada para la obtención del hidrolizado ácido de caseína, hizo que BioCen contara con un producto cuya calidad correspondiera con los estándares establecidos internacionalmente. El elevado nivel de consumo de este hidrolizado en fermentaciones a gran escala para la obtención de productos vacunales y como ingrediente fundamental de medios de cultivo para el diagnóstico clínico, hace que esta base sea muy demandada por el mercado nacional e internacional.⁶

Por causa de la importancia de la utilización de esta base nutritiva, el objetivo del presente trabajo consistió en la caracterización de un hidrolizado ácido de caseína obtenido en BioCen a escala industrial y su desempeño en los medios de cultivo.

MÉTODOS

Materiales

Se utilizó caseína láctica procedente de la firma Zahorí Co. (México), con un contenido de proteínas, en base seca, mayor que 90 %. Como agente hidrolizante se empleó el ácido clorhídrico 37 % (Merck, Alemania). El hidróxido de sodio (Panreac, España), en solución a 40 % (p/p), sirvió en calidad del agente neutralizante.

Hidrólisis de caseína

Se mezcló la caseína en polvo, el agua desionizada y ácido clorhídrico en un reactor de vidrio, manteniendo la mezcla en agitación constante durante 11 h a temperatura de 110 °C y presión atmosférica. Transcurrido este tiempo, se procedió a la destilación del exceso de ácido. Seguidamente se ajustó el pH al punto isoeléctrico de la caseína,² de forma tal que precipitaran las proteínas no hidrolizadas. El proceso de decoloración se realizó adicionando carbón activado al hidrolizado. A continuación se llevó a cabo la filtración clarificante seguida de la neutralización del hidrolizado ácido de caseína y su deshidratación mediante el secado por aspersión, con la temperatura de aire de entrada a la cámara de secado de 180 °C y de salida de 90 °C.

Análisis físico-químico

Se aplicó a los 10 lotes del producto obtenido a escala industrial, considerando este número de lotes como representativo para demostrar la consistencia del proceso industrial. Este análisis comprendió la determinación del contenido de nitrógeno amínico (N_{am}) por el método de valoración potenciométrica en presencia de formaldehído;⁷ contenido de nitrógeno total (N_t) por el método de Kjeldahl,

utilizando el sistema automático Kjeltex System de la Firma TECATOR (Alemania);⁸ la pérdida por desecación (PD) por el método gravimétrico⁷ y el contenido de cloruros (NaCl), en forma de cloruro de sodio, por el método de Volhard.⁷ De forma aleatoria fueron seleccionados 3 lotes de la base nutritiva, para determinar el contenido de aminoácidos con ayuda de un analizador de aminoácidos, modelo Alpha Plus,⁹ y el contenido de minerales (macroelementos Ca^{2+} y Mg^{2+}), por el método espectrofotómetro de absorción atómica SP9.¹⁰

Evaluación del desempeño

Consistió en la determinación de la densidad microbiana en el tiempo y la realización de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Determinación de la densidad microbiana en el tiempo: se seleccionaron 3 lotes del hidrolizado ácido de forma aleatoria. Este trabajo se acometió mediante el método espectrofotométrico, estudiando el incremento de la densidad óptica a una longitud de onda de 640 nm en el tiempo, en un medio que contenía hidrolizado ácido de caseína 2 % (p/p); 0,5 % (p/p) de NaCl (Merck, Alemania) y 0,1 % (p/p) de Na_2HPO_4 (Merck, Alemania) a pH 7,0-7,2.¹¹ La incubación de los cultivos se realizó durante 7 h a 35 °C en un baño con control automático de temperatura (Gallenkamp, Reino Unido), bajo agitación; la lectura de los resultados se efectuó con una frecuencia de 1 h. La representación gráfica se ejecutó utilizando las medias de los valores obtenidos para los 3 lotes seleccionados.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: fueron aplicadas de acuerdo con las recomendaciones de la *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, en el documento M100-S17 correspondiente al método de difusión en disco¹². Se evaluó un total de 6 drogas antimicrobianas (Oxoid, Inglaterra): carbenicilina 100 µg (CAR), amikacina 30 µg (AK), eritromicina 15 µg (E), cloranfenicol 30 µg (C), gentamicina 10 µg (CN) y la tetraciclina 30 UI (T).

Microorganismos, medios de cultivo y productos de referencia

Se emplearon cepas de colección de la *American Type Culture Collection (ATCC)*: *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* 27853. Las suspensiones microbianas se prepararon a partir de un cultivo puro en caldo triptona soya (BioCen, Cuba),⁶ incubado durante 24 h a 35 °C. Los medios de cultivo caldo de Mueller-Hinton y agar de Mueller-Hinton se prepararon según las formulaciones de BioCen.⁶ Se utilizaron los hidrolizados ácidos de caseína de las firmas Biotécnica Internacional (México, lote 011175); Merck (Alemania, lote VM752545138) y Oxoid (Inglaterra, lote 273015) para la preparación de los medios de cultivo controles.

Análisis estadístico

Se aplicaron diferentes tratamientos estadísticos mediante los paquetes de programas STATISTICA (Versión 6.1, Statsoft, Inc. 2003) y STATGRAPHICS PLUS (Versión 5.1, Statsoft, Inc. 2000). Para el análisis de los resultados se calcularon la media, la desviación estándar y, en los casos requeridos, se empleó la prueba de Tukey y la prueba de rangos múltiples para comparar las diferencias entre las medias con un nivel de confianza de 95 % ($p < 0,05$).

RESULTADOS

En la [figura 1](#) se muestran los resultados obtenidos en la evaluación físico-química de los 10 lotes de hidrolizado ácido de caseína obtenidos en BioCen a escala industrial, en comparación con los productos de referencia.

El valor promedio del contenido de nitrógeno amínico de los lotes de hidrolizado ácido de caseína estudiados resultó de $6,59 \pm 0,71$ %. El tratamiento estadístico realizado arrojó que no existen diferencias significativas (para $p < 0,05$) entre los lotes experimentales y los productos empleados como referencia (Biotécnica Internacional, Merck y Oxoid).

El contenido de nitrógeno total correspondió a $8,12 \pm 0,42$ % para los lotes experimentales, no se observaron diferencias significativas con respecto a los lotes procedentes de Biotécnica Internacional y Oxoid. Se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) para el contenido de nitrógeno total en comparación con el producto de la firma Merck.

Los valores de cloruro de sodio obtenidos oscilaron entre 28,9 y 33,97 %, para los 10 lotes de hidrolizado ácido de caseína; se encuentran en un rango intermedio con respecto a los productos de otros proveedores estudiados.

El valor promedio de la pérdida por desecación del polvo deshidratado obtenido correspondió a $3,54 \pm 0,67$ %. Para este índice no se encontraron diferencias significativas con un nivel de confianza de 95 %.

El contenido de aminoácidos totales en el hidrolizado ácido de caseína BioCen resultó superior, de forma general, a los valores correspondientes a los hidrolizados de referencia (alanina 6,76 %; arginina 5,73 %; asparagina 7,72 %; glicina 2,85 %; isoleucina 5,89 %; leucina 17,15 %; metionina 4,72 %; serina 5,68 %; tirosina 5,02 % y valina 10,83 %). Para los aminoácidos cistina (0,85 %); lisina (3,09 %) y fenilalanina (3,30 %), los valores resultaron similares a los hidrolizados procedentes de Biotécnica Internacional y Merck. Los aminoácidos glutamina (7,85 %), prolina (4,82 %), triptófano (0,1 %) y tirosina (3,37 %), se encontraron en menor cuantía en el hidrolizado BioCen con respecto a los productos de fabricantes extranjeros ensayados.

El valor promedio del contenido de iones de calcio presentes en esta base nutritiva alcanzó 334 mg/L, se encuentran por debajo de los niveles obtenidos en las bases nutritivas de referencia (Biotécnica Internacional, 425 mg/L y Merck, 452 mg/L). Por otra parte, los iones de magnesio mostraron un valor de 133 mg/L para la base nutritiva en estudio, resulta inferior a los lotes de Biotécnica Internacional (265 mg/L) y Merck (523 mg/L).

En la [figura 2](#) se presentan los resultados de las curvas de crecimiento para los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los valores de absorbancia no reflejaron diferencias significativas (para $p < 0,05$) entre los lotes experimentales (valor promedio de los 3 lotes) y los hidrolizados de otros fabricantes (Biotécnica Internacional, Merck y Oxoid).

Se demostró que los lotes producidos en BioCen son capaces de promover el crecimiento microbiano hasta altas diluciones (3×10^2 UFC/mL), en el medio caldo de Mueller-Hinton, con un comportamiento similar al de los medios de referencia empleados en el estudio.

En la tabla se observan los resultados de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana para los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 25922;

Staphylococcus aureus ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La susceptibilidad de estos microorganismos frente a los antimicrobianos CAR, AK, E, C, CN, T, se comportó de acuerdo con los requerimientos establecidos por las normas CLSI.¹² Se obtuvo la total coincidencia de los halos de inhibición alcanzados para todas las cepas de microorganismos, objetos de este estudio, frente a cada uno de los antimicrobianos utilizados, tanto para el medio experimental como para los productos de referencia (Biotécnica Internacional, Merck y Oxoid).

Tabla. Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Antimicrobiano	HAC	Diámetros de los halos de inhibición, (mm)					
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Requisitos de las Normas CLSI	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Requisitos de las Normas CLSI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Requisitos de las Normas CLSI
Carbencilina	BioCen	24,10 ± 1,05	(24-29)			21,04 ± 0,45	(19-26)
	Biotécnica	25,66 ± 1,36				20,18 ± 0,83	
	Merck	24,16 ± 1,47				20,18 ± 0,83	
	Oxoid	24,33 ± 1,32				20,18 ± 0,83	
Amikacina	BioCen	23,96 ± 0,98	(19-26)			21,88 ± 0,94	(19-26)
	Biotécnica	24,33 ± 2,66				20,83 ± 2,84	
	Merck	24,17 ± 1,72				21,17 ± 0,98	
	Oxoid	24,83 ± 1,33				22,83 ± 1,17	
Eritromicina	BioCen	11,61 ± 1,49	(11-14)	24,63 ± 1,86	(19-26)		
	Biotécnica	11,33 ± 0,81		25,50 ± 2,42			
	Merck	12,83 ± 1,72		27,16 ± 4,44			
	Oxoid	11,66 ± 2,06		24,83 ± 1,94			
Cloranfenicol	BioCen	26,93 ± 0,88	(21-28)	23,43 ± 1,26	(19-26)		
	Biotécnica	26,00 ± 1,54		23,50 ± 0,88			
	Merck	27,54 ± 1,64		24,33 ± 2,80			
	Oxoid	28,00 ± 1,94		23,16 ± 1,45			
Gentamicina	BioCen	23,89 ± 0,66	(19-26)	23,04 ± 1,05	(19-26)	20,36 ± 2,63	(19-26)

	Biotécnica	26,00 ± 0,89		22,83 ± 1,32		19,00 ± 2,88
	Merck	25,00 ± 1,26		23,05 ± 0,83		19,17 ± 2,64
	Oxoid	24,00 ± 1,32		23,83 ± 1,32		20,17 ± 1,94
Tetraciclina	BioCen	21,63 ± 0,99	(18- 25)	24,17 ± 1,20	(19- 26)	
	Biotécnica	22,33 ± 2,87		24,50 ± 1,51		
	Merck	21,33 ± 2,58		23,33 ± 3,38		
	Oxoid	23,16 ± 1,94		25,86 ± 3,06		

HAC: hidrolizado ácido de caseína; CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; BioCen: agar de Mueller-Hinton con el hidrolizado ácido de caseína BioCen; Biotécnica: agar de Mueller-Hinton con el hidrolizado ácido de caseína Biotécnica, México; Merck: agar de Mueller-Hinton con el hidrolizado ácido de caseína Merck, Alemania; Oxoid: agar de Mueller-Hinton con el hidrolizado ácido de caseína Oxoid, Inglaterra.

DISCUSIÓN

Los parámetros fijados durante el proceso de hidrólisis ácida, junto con la materia prima empleada, fueron apropiados para obtener valores de nitrógeno amínico que coincidan con los reportados por diferentes fabricantes (4-8 %).^{1,5}

El contenido de fracciones nitrogenadas proteicas y no proteicas (nitrógeno total), presentes en el hidrolizado ácido de caseína BioCen, se hallan dentro de los límites de aceptación descritos (6,4-8,5 %).^{5,13} La diferencia significativa entre el hidrolizado obtenido y el hidrolizado de la firma Merck pudo estar dada por la naturaleza proteica del sustrato, pues al ser este de origen biológico no se puede definir exactamente su comportamiento en relación con el contenido de las diferentes fracciones proteicas obtenidas por una hidrólisis inespecífica.¹⁴

Según lo reportado por *Bridson*,¹⁵ el elevado contenido de iones de cloruro, presentes en el hidrolizado ácido de caseína, se debe a que la hidrólisis transcurre bajo la acción del ácido clorhídrico, cuyos iones reaccionan con el hidróxido de sodio durante el proceso de neutralización y se obtiene el cloruro de sodio. Los valores logrados se encuentran por debajo del límite superior (45 %), establecido por *Organotechnie*, 1994.¹⁶ Las diferencias entre los valores de los 10 lotes industriales y los de referencia empleados, pueden deberse al volumen y concentración de ácido clorhídrico utilizados, así como a las diferencias en el proceso tecnológico empleado por los diferentes productores.

La elevada humedad relativa que existe en Cuba favorece las interacciones químicas que deterioran el producto durante su almacenamiento, puede afectarse su vida útil. En este caso, el adecuado control de la temperatura y humedad en los locales de producción de BioCen permitieron que los valores de pérdida por desecación del hidrolizado obtenido, estuvieran por debajo del límite superior establecido por algunas casas productoras (8 %).⁵

Los estudios realizados por *Rodríguez* y otros⁴ demostraron que las condiciones, en las que ocurre la hidrólisis ácida, provocan la destrucción parcial o total de algunos aminoácidos esenciales. No obstante, el empleo de este método de hidrólisis en la obtención de hidrolizado ácido de caseína permitió disponer de una mayor proporción de fracciones proteicas de bajo peso molecular; esto demuestra que el producto puede ser empleado en la preparación de medios de cultivo en los que se requieran altas concentraciones de aminoácidos como fuente de nitrógeno, así como en la preparación de toxina tetánica y vacunas *Bordetella pertusis*.¹⁷

Los cationes divalentes actúan como cofactores o activadores enzimáticos para el desarrollo de los microorganismos en los medios de cultivo.¹⁸ Concentraciones apropiadas de Ca^{2+} y Mg^{2+} hacen posible el adecuado funcionamiento del medio agar de Mueller-Hinton.¹⁵ Las concentraciones de cationes divalentes en el producto estudiado son inferiores a los controles empleados y a los reportes realizados por la CLSI¹² (Ca^{2+} 20-25 mg/L y Mg^{2+} 10-12,5 mg/L), y por tanto, brinda la posibilidad de ajustar sus niveles en la producción de agar de Mueller-Hinton.¹⁹

Al observar la velocidad de crecimiento microbiano de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, se puede concluir que la base nutritiva desarrollada suministra los nutrientes adecuados para realizar la síntesis de numerosos compuestos orgánicos, necesarios para el crecimiento de estos microorganismos.

Los aminoácidos libres y polipéptidos que contiene el hidrolizado ácido de caseína, junto con las fracciones proteicas de mayor peso molecular aportado por el extracto de carne, contribuyen a una mezcla idónea de nutrientes que aumenta la sensibilidad del medio caldo de Mueller-Hinton, al permitir el desarrollo de diferentes microorganismos a altas diluciones.²⁰

Los hallazgos obtenidos en la evaluación fisicoquímica del producto permitieron establecer los límites de los diferentes parámetros de calidad del hidrolizado ácido de caseína, obtenido por primera vez en Cuba. El contenido de nutrientes y la ausencia de inhibidores en el hidrolizado ácido de caseína, favorecen una adecuada actividad antibacteriana de los antibióticos ensayados. La concentración de iones divalentes permitió asegurar el adecuado comportamiento de *Pseudomonas aeruginosa* frente a los aminoglucósidos. La confiabilidad de los valores de susceptibilidad desarrollada en el medio de cultivo agar de Mueller-Hinton, producido en BioCen, hace posible su utilización en la red de salud pública para la realización sistemática de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhurbenko R. Metodología para el aprovechamiento de los subproductos de la industria alimenticia y otras proteínas en la evaluación de la calidad sanitaria de los alimentos [Tesis doctoral]. Ciudad de la Habana: Universidad de La Habana; 2005.
2. Salinas RD. Alimentos y nutrición. Bromatología aplicada a la salud. 2da ed. Madrid: El Ateneo; 2000. p. 236.
3. Nguven Thi Quynh A, Biyaoula D, Demeaux M, Lorient D. Surface active properties of soy proteins: improvement by limited chemical hydrolysis. Sci des Alim. 1992;12(1):117-30.

4. Rodríguez Martínez C, Barroetabeña Márquez FR, García Marichal JM, Montero Veitía HJ, Varela Llanes AE, Zhurbenko R, inventores; Centro Nacional de Biopreparados, titular. Método de obtención de hidrolizado proteico. Patente de Cuba 22 089. 1992 sep 9.
5. Merck. Microbiology Manual. Darmstadt. Alemania: Merck; 2000. p. 293.
6. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Quesada Muñiz VJ, Lobaina Rodríguez T, Tsoraeva A, Díaz Pérez M et al. Manual de medios de cultivo. 3ra ed. Ciudad de La Habana: BioCen; 2004. p. 263.
7. USP 27-NF-22. The United States Pharmacopeia. Twenty Seventh Revision. The National Formulary Twenty second edition en CD-ROM User Guide. Reagents. Pancreatic Digest of Casein [monografía en CD-ROM]. United Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville: Staff Liaison; 2004.
8. Tecator. Determination of Kjeldahl nitrogen content with Kjeltex System 1026. Application Note. Sweden; 1987.
9. Davies MG, Thomas AJ. An investigation of hydrolytic techniques for the amino acid analysis of foodstuffs. J Sci Food Agric. 1973;24: 1525-40.
10. Standard Operating Procedure. No. 313. Analysis for Minerals in Animal Feed. National Center for Toxicological Research Division of Chemistry; 1994.
11. Biochemiclas and Reagents for like Science Research. St. Louis: SIGMA-ALDRICH; 2000. p. 1534.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M 100-S17. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2007.
13. Manual Oxoid. Basingstoke, England: Unipath Limited; 1995. p. 389.
14. López Hernández OD. Análisis del proceso productivo de la Peptona Bacteriológica Z con vistas a mejorar su calidad [Tesis universitaria]. Ciudad de La Habana: ISPJAE; 2003.
15. Bridson E. The development manufacture and control of microbiological culture media. Unipath Ltd; 1994. p. 250.
16. Culture media constituentes. La Courneuve, France: Organotechnie; 1994.
17. Medios de cultivo deshidratados y reactivos para Microbiología. DIFCO. T. I. 10ma ed; 1984. p. 208.
18. Anónimo. Funciones de los nutrientes minerales (macronutrientes). Universidad Nacional de Colombia. 2005 (citado 5 Mar 2009). Disponible en: URL: <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/cap03/01-09.htm>
19. Pasterán F, Corso A, Galas M. Manual de Procedimientos. Pruebas de sensibilidad a los antimicribianos. Parte 2; 2003. p. 14.

20. Konemam EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Wenn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 1395.

Recibido: 12 de octubre de 2008.
Aprobado : 10 de marzo de 2009.

M. C. *Diana Rosa Viera Oramas*. Centro Nacional de Biopreparados. Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, La Habana, Cuba. Tele/fax: 047-682835. Correo electrónico: diana@biocen.cu