

Uso de la miel de *Apis mellifera* en agar base para diferenciar cepas bacterianas con característica oxidativa-fermentadora

Use of honey of *Apis mellifera* on base agar to differentiate bacterial strains with oxidative-fermenting characteristic

Héctor Vilchez Cáceda¹, Luis Cervantes Ganoza², Miguel Inocente Camones¹

¹ Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Lima Perú

² Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica . Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Facultad de Estomatología. Lima. Perú

<http://dx.doi.org/10.30827/ars.v60i2.8682>

Artículo original Original Article

Correspondencia Correspondence

Héctor Vilchez Cáceda
Correo electrónico: hvilchezc@uigv.edu.pe

Financiación Fundings

Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

Conflicto de interés Competing interest

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Agradecimientos Acknowledgements

Al Dr. Luis Cervantes Liñan. Rector de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega por brindarnos el equipamiento de los laboratorios de Ciencias Básicas y de Especialidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la U.I.G.V.

Received: 08.02.2019
Accepted: 01.04.2019

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el uso de la miel de *Apis mellifera* (miel de abeja) en agar base como diferenciador de oxidante-fermentador de carbohidratos en cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212.

Métodos: Se realizó un tamizaje fitoquímico preliminar de la miel de abeja. Para evaluar el uso del agar con miel de abeja como diferenciador oxidativo-fermentador, se emplearon 96 tubos de cultivo que contienen 10 mL de agar base aleatorizadas y divididas en cuatro grupos de 24 tubos: grupo I agar base con miel y *Escherichia coli* ATCC 25922, grupo II agar base con miel y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212, grupo III agar OF (Basal Medium acc. To Hugh and Leifson, Merck) con *Escherichia coli* ATCC 25922, y el grupo IV agar OF con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212; siendo el agar OF estándar. Se consideraron dos criterios de evaluación: Oxidación y Fermentación de los carbohidratos.

Resultados: La miel de abeja presenta alcaloides, triterpenoides y compuestos fenólicos. Se determinó el calificativo de Bueno (100%) para el agar con miel de abeja y *Escherichia coli* ATCC 25922, y agar con miel de abeja y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212; comparado con el agar OF.

Conclusión: El uso del agar con miel de *Apis mellifera* (miel de abeja) ha evidenciado ser bueno como alternativa al agar OF (Basal Medium acc. To Hugh and Leifson) para diferenciar *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 como oxidantes y fermentadoras de carbohidratos.

Palabras Claves: *Apis mellifera*; miel de abeja; oxidación de carbohidratos; fermentación de carbohidratos.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the use of *Apis mellifera* (honey) on base agar as an oxidant-carbohydrate fermentor differentiator in strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212.

Methods: Preliminary phytochemical screening of honey was carried out. Using agar with bee honey as an oxidative-fermenter differentiator, use 96 culture tubes containing 10 ml of randomized base agar and divided into four groups of 24 tubes: group I base agar with honey and *Escherichia coli* ATCC 25922, group II agar base with honey and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212, group III agar OF (basal medium according to Hugh and Leifson, Merck) with *Escherichia coli* ATCC 25922, and group IV agar OF with *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212; being the standard OF agar. Two evaluation criteria were considered: Oxidation and Fermentation of carbohydrates.

Results: Bee honey has alkaloids, triterpenoids and phenolic compounds. The qualifier of Good (100%) was determined for the grip with honey and *Escherichia coli* ATCC 25922, and agar with honey and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212; compared with the agar OF.

Conclusion: The use of agar with honey of *Apis mellifera* has been shown as good as an alternative to agar OF (Basal medium according to Hugh and Leifson) to differentiate *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 as oxidants and carbohydrate fermentors.

Key words: *Apis mellifera*; honey; carbohydrate oxidation; carbohydrate fermentation.

INTRODUCCIÓN

La miel de *Apis mellifera* (miel de abeja) es el único producto natural endulzante que puede ser almacenado y usado tal cual es producido en la naturaleza, no requiere procesamiento o purificación^{1,2}. En el transcurso de la historia su uso fue exclusivamente con fines religiosos o medicinales, posteriormente los griegos y romanos lo incorporaron como ingrediente a su dieta^{2,3}. En su composición los carbohidratos constituyen el 80,0% de su peso seco y varían según la clase de miel: fructosa 28,0 a 44,0%; glucosa 22,0 a 38,0%; sacarosa 0,2 a 5,0%; maltosa 2,0 a 16,0%; otros azúcares 0,1 a 8,0%; proteínas y aminoácidos 0,2 a 2,0%; vitaminas, minerales y metabolitos secundarios^{4,6}. Asimismo, presenta actividad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria y otras funciones bioquímicas y farmacológicas^{1,7,8}.

El agar OF (Basal Medium acc. To Hugh and Leifson, Merck), usado como gold estándar contiene peptona de caseína, cloruro de sodio, fosfato dipotásico, hidrato de carbono, agar-agar, agua destilada e indicador de pH como el Azul de Bromotimol⁹⁻¹¹ empleado para clasificar y diferenciar microorganismos gram-negativos en base al metabolismo fermentativo y oxidativo de los carbohidratos^{12,13}. Las bacterias sacarolíticas degradan el hidrato de carbono, ya sea por fermentación o por oxidación¹⁴; la fermentación es un proceso anaeróbico que requiere la fosforilación inicial, utiliza las vías de la Glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas) y de las pentosas fosfato y Entner-Doudorof, y la oxidación de la glucosa produce ácido pirúvico por una vía de derivación (Shunt) en condiciones estrictamente aeróbicas y no requiere de fosforilación inicial¹⁵⁻¹⁸.

Se realizó un estudio experimental, analítico y transversal, el cual estuvo orientado a evaluar si el uso del agar miel de *Apis mellifera* permite diferenciar bacterias oxidativas y fermentadoras, comparadas con el agar OF. Las bacterias oxidativas producen ácidos solo en el tubo de ensayo expuesto al oxígeno atmosférico; las bacterias fermentadoras producen ácidos en tubo de ensayo expuesto al oxígeno y en tubo sellado sin exposición a oxígeno; asimismo, las bacterias no sacarolíticas son inertes en este medio con pH alcalino después de la incubación^{10,11,15,17}. Por tal motivo, se diseñó un método analítico *in vitro* en base a miel de abeja para la diferenciación de bacterias oxidativas y fermentadoras, tomando de base las técnicas sustentadas en investigaciones nacionales e internacionales, garantizando la confiabilidad de los datos obtenidos^{7,10,16,18,19}.

MÉTODOS

Muestra de análisis

La miel de *Apis mellifera* de tipo multifloral, obtenido de apicultores de la Comunidad Campesina de Pargay, distrito de Chuquibambilla, provincia de Grau, departamento y región de Apurímac, en Perú.

Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 proceden del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; se reactivaron a 25°C por 2 horas, luego se rehidrataron con 1 mL de caldo infusión cerebro corazón (ICC), después se sembraron en agar sangre y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Tamizaje fitoquímico

La identificación de metabolitos secundarios se realizó a través de pruebas químicas de caracterización: reacción de Molish (azúcares reductores), reacción con ninhidrina (aminoácidos), reacción de Dragendorf, (alcaloides), reacción de Shinoda (flavonoides), prueba de la espuma (saponinas), reacción con el tricloruro férrico (compuestos fenólicos), reacción con gelatina (taninos), reacción de Lieberman-Burchard (esteroides y triterpenoides), reacción de Bornträger (antraquinonas)^{20,21}.

Modelo experimental in vitro

Para la preparación del agar de miel de abeja, se agregaron 10,0 gramos de miel, 0,5 gramos de NaCl y 0,01 gramo de azul de bromotimol en un balón, se le agregó 50,0 mL de agua destilada y se homogenizó por 2 minutos; se adicionó 0,3 gramos de agar-agar con 50,0 mL de agua destilada y se homogenizó a 50°C por 5 minutos. Posteriormente el medio se sometió a esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión^{9,14}; luego se dispensó 10,0 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo 16X100 mm; se solidificó a temperatura ambiente; y se almacenó a 4,0±2,0°C^{9,14}. Para la preparación del agar OF, se utilizó la información técnica bibliográfica^{10,18,19}.

Se prepararon 96 tubos de ensayo 16X100 mm; conteniendo 10,0 mL de agar aleatorizadas y divididas en cuatro grupos de 24 tubos (12 tubos con 1,5 mL de parafina estéril y 12 tubos sin parafina): grupo I agar con miel de *Apis mellifera* con *Escherichia coli* ATCC 25922, grupo II agar con miel de *Apis mellifera* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212, grupo III agar OF con *Escherichia coli* ATCC 25922 y el grupo IV agar OF con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212; siendo el agar OF considerado como gold estándar, como se muestra en la tabla 1^{10,18,19}.

Tabla 1. Medios de cultivo preparados según tipo de cepa y agar

N°	TIPO DE CEPA	AGAR				TOTAL
		Grupo I: Agar Miel de <i>Apis mellifera</i>	Grupo II: Agar Miel de <i>Apis mellifera</i>	Grupo III: Agar OF-Hugh Leifson	Grupo IV: Agar OF-Hugh Leifson	
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	12	12	12	12	48
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29212.	12	12	12	12	48
TOTAL		24	24	24	24	96

Evaluación e interpretación de los medios de cultivo

Para la evaluación macroscópica e interpretación de los resultados obtenidos en los medios de cultivo se utilizaron dos criterios: Oxidación de carbohidratos (Virage del indicador cerca de la superficie del agar) y Fermentación de carbohidratos (Virage del indicador en el tubo de ensayo cubierto de parafina líquida).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tabulados utilizando el programa Microsoft Excel 2016.

Aspectos éticos

Al realizar el presente estudio, se tuvo en cuenta las normas de Bioseguridad y las recomendaciones para el manejo de cepas bacterianas según el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la Organización Mundial de la Salud²².

RESULTADOS

Del tamizaje fitoquímico

En la tabla 2 se describen los metabolitos secundarios hallados en la miel de *Apis mellifera*.

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico de la miel de *Apis mellifera*

Metabolito Secundario	Reactivo	Resultado ^a
Carbohidratos	Molish	+++
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	++
Taninos	Gelatina	+
Flavonoides	Shinoda	+
Antocianinas	Rosenheim	-
Aminoácidos libres	Ninhidrina	-
Alcaloides	Dragendorff	+++
Quinonas	Bornträger	-
Triterpenoides	Liebermann	+++
Saponinas	Espuma	-
Glicósidos cardiotónicos	Baljet	+++
Lactonas	Legal	-
Cumarinas	NaOH 10%	-

^a +++ Abundante, ++ Regular, + Poco, - Ausencia

De la evaluación macroscópica e interpretación de los medios de cultivo

En la tabla 3 se evaluó la oxidación positiva y en la tabla 4 se evaluó la fermentación positiva de los carbohidratos en el agar miel de *Apis mellifera* y el agar OF, con crecimiento de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922; y se obtuvo en ambos agares un calificativo de Bueno (100%)¹⁹.

En la tabla 5 se evaluó la oxidación positiva y en la tabla 6 se evaluó la fermentación negativa de los carbohidratos en el agar miel de *Apis mellifera* y el agar OF, con crecimiento de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212; y se obtuvo en ambos agares un calificativo de Bueno (100%)¹⁹.

Tabla 3. Evaluación de la oxidación positiva de carbohidratos en agares con *Escherichia coli* ATCC 25922

Oxidación de Carbohidratos (+)	Agar				
	Miel de <i>Apis mellifera</i>		OF-Hugh Leifson		
	Nº Agares	Resultado (%)	Nº Agares	Resultado (%)	
Buena	80 - 100%	12	100%	12	100%
Regular	60 - 79%	00	00%	00	00%
Mala	50 - 59%	00	00%	00	00%
Total		12	100%	12	100%

Tabla 4. Evaluación de la fermentación positiva de carbohidratos en agares con *Escherichia coli* ATCC 25922

Fermentación de Carbohidratos (+)	Agar				
	Miel de <i>Apis mellifera</i>		OF-Hugh Leifson		
	Nº Agares	Resultado (%)	Nº Agares	Resultado (%)	
Buena	80 - 100%	12	100%	12	100%
Regular	60 - 79%	00	00%	00	00%
Mala	50 - 59%	00	00%	00	00%
Total		12	100%	12	100%

Tabla 5. Evaluación de la oxidación positiva de carbohidratos en agares con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212

Oxidación de Carbohidratos (+)	Agar				
	Miel de <i>Apis mellifera</i>		OF-Hugh Leifson		
	Nº Agares	Resultado (%)	Nº Agares	Resultado (%)	
Buena	80 - 100%	12	100%	12	100%
Regular	60 - 79%	00	00%	00	00%
Mala	50 - 59%	00	00%	00	00%
Total		12	100%	12	100%

Tabla 6. Evaluación de la fermentación negativa de carbohidratos en agares con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212

Fermentación de Carbohidratos (-)	Agar				
	Miel de <i>Apis mellifera</i>		OF-Hugh Leifson		
	N° Agares	Resultado (%)	N° Agares	Resultado (%)	
Buena	80 - 100%	12	100%	12	100%
Regular	60 - 79%	00	00%	00	00%
Mala	50 - 59%	00	00%	00	00%
Total		12	100%	12	100%

DISCUSIÓN

Los países de Sudamérica presentan por sus características geográficas y su diversidad de climas una gran variedad de flora natural y cultivada (multifloral) la cual brinda posibilidades tecnológicas para la apicultura rentable y sostenible²³. La clasificación de la miel de abeja es variada y su composición química depende de factores geográficos, fuentes botánicas, condiciones climáticas, entre otros^{1-3,24}. En la Comunidad de Pargay, distrito de Chuquibambilla, provincia de Grau, departamento y región de Apurímac, en Perú; se cultivan diferentes especies de plantas medicinales; por tal motivo en la miel de abeja se identificaron metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, alcaloides, triperpenoides y glicósidos cardiotónicos; los cuales probablemente ejercen efectos en el desarrollo bacteriano^{5,25}.

Diversos estudios^{2,4-6} indican que la miel de abeja debido a su elevado contenido en azúcares simples su asimilación digestiva es rápida, altamente calórica por lo cual resulta útil como fuente de energía, además de contener calcio, cobre, magnesio, manganeso zinc, fósforo y vitaminas principalmente vitamina A, D, E, C, B6, B12 y E; asimismo, otros estudios^{2,28} señalan la presencia de aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos. Es por ello que la miel de abeja, al presentar una composición de bioelementos primarios, secundarios y oligoelementos permite que las cepas bacterianas en estudio puedan desarrollarse en el agar con miel.

Al realizar la lectura de los medios de cultivo, el 100% de agares preparados con miel de abeja para el desarrollo de las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 resultaron con el calificativo de Bueno en los dos criterios de evaluación; comparado con el agar OF (Basal Medium acc. To Hugh and Leifson). Estudios previos sobre la miel de abeja describen actividad antibacteriana a diferentes concentraciones según ubicación geográfica de la colecta^{1,25-29}; motivo por el cual se evaluó

la actividad antibacteriana de la miel de abeja a concentraciones de 5% y 10% en el agar con miel de abeja para el crecimiento de las cepas descritas anteriormente, y se obtuvo como resultado el efecto no inhibitorio del crecimiento; esto se debe a que durante el proceso de elaboración del agar con miel de abeja fue sometido al proceso de esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión¹³⁻¹⁵.

Según diversos autores³⁰⁻³³; son conocidas las propiedades físicas de los carbohidratos como el punto de fusión de D(+)Glucosa a 146°C; D(-)Fructosa a 103°C; D(+)Sacarosa a 184°C y punto de ebullición de la D(+)Maltosa a 102°C, considerando ello y de acuerdo al experimento las estructuras químicas de la glucosa y sacarosa posiblemente no sufrieron cambios después del proceso de esterilización, lo cual se corrobora a las 24 horas de incubación, donde se aprecia el viraje del indicador de pH, lo cual confirma el metabolismo oxidativo o fermentador de las cepas en estudio.

CONCLUSIÓN

En condiciones experimentales el uso del agar con miel de *Apis mellifera* (miel de abeja) ha evidenciado ser bueno como alternativa al agar OF (Basal Medium acc. To Hugh and Leifson) para diferenciar *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 como oxidantes y fermentadoras de carbohidratos.

REFERENCIAS

1. Cabrera L, Ojeda G, Céspedes E, Colina A. Actividad antibacteriana de miel de abejas multiflorales (*Apis mellifera* Scutellata) de cuatro zonas apícolas del Estado Zulia, Venezuela. *Rev Cient.* 2003; 13(3): 205-211.
2. Ulloa J, Mondragón P, Rodríguez R, Reséndiz J, Ulloa P. La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente.* 2010; 2(4): 11-18.

3. Bradbear N. La apicultura y los medios de vida sostenible. Folleto de la FAO sobre diversificación 1. 2005, Roma.
4. Swallow K, Low N. Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* 1990; 38(9): 1828-1832. DOI: 10.1021/jf00099a009
5. Missio P, Gauche C, Gonzaga L, Oliveira A. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry.* 2016; 196: 309-323. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.051.
6. Qiu P, Ding H, Tang Y, Xu R. Determination of chemical composition of commercial honey by near infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1999; 47(7): 2760-2765. DOI: 10.1021 / jf9811368
7. Vega C, Gutiérrez C, Díaz C. Actividad antimicrobiana de mieles de *Apis mellifera* de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Rev Fac Nal Agr.* 2014; 67(2): 743-745.
8. San José J, San José M. La miel como antibiótico tópico en las úlceras por presión. Actualización. *Medicina Naturista.* 2015; 9(2): 93-102.
9. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 6 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
10. Welch D, Muszynski M, Pai C, et al. Selective and differential medium for recovery of *Pseudomonas cepacia* from the respiratory tracts of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1987; 25: 1730-1734.
11. Murray R, Patrick S. Microbiología Médica. 6ª ed. Barcelona: Editorial Elsevier; 2006.
12. Tortora F. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007.
13. Parés R, Juárez A. Bioquímica de los Microorganismos. 1ª ed. Barcelona: Editorial Reverté S.A.; 2012.
14. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2003.
15. Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiología. 5ª ed. Madrid: Editorial McGraw-Hill; 2004.
16. Nelson D, Cox M. Lehninger Principios de Bioquímica. 5ª ed. Barcelona: Editorial Omega S.A.; 2009.
17. Ryan K, Ray C. Sherris Microbiología Médica. 5ª ed. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2011.
18. Costin I. An outline for the biochemical identification of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods of medical interest. 5. *Intern. Kongr. f. Chemotherapie Wien, B2/1.* 1967: 73-76.
19. Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J Bact* 1953; 66: 24-26.
20. Lock O. Investigación fitoquímica. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, 1994.
21. Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Editorial Omega S.A; 2000.
22. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3ª ed. Ginebra: OMS; 2005.
23. Ministerio de Agricultura y Riego. [Internet]. Plan Nacional de Desarrollo Apícola 2015-2025. [actualizado 07 febrero 2019; citado 07 febrero 2019]. Disponible: <https://bit.ly/2DXZ5ew>
24. Parra G, Gonzáles V. Las abejas silvestres de Colombia: Por qué y como conservarlas. *Acta Biológica Colombiana.* 2000; 5(1): 5-37. DOI: 10.15446/abc
25. Sherlock O, Dolan A, Athman R, et al. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2010; 10(1): 47. DOI: 10.1186 / 1472-6882-10-47
26. Montenegro G, Salas F, Peña RC, Pizarro R. Actividad antibacteriana y antifúngica de mieles monoflorales de *Quillaja saponaria*, especie endémica de Chile. *Phyton.* 2009; 78(2): 141-146.
27. Mandal S, DebMandal M, Kumar N, Saha K. Antibacterial activity of honey against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 2010; 3(12): 961-964. DOI: 10.1016 / S1995-7645 (11) 60009-6
28. Hermosín I, Chicón R, Cabezudo M. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry.* 2003; 83(2): 263-268. DOI: 10.1016 / S0308-8146 (03) 00089-X
29. Wilkinson J, Cavanagh H. Antibacterial activity of 13 honeys against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Food.* 2005; 8(1): 100-103. DOI: 10.1089 / jmf.2005.8.100
30. Gómez C, Palma S. Libro Blanco del Azúcar. 1ª ed. Madrid: Editores Médicos; 2013.
31. Hurtt M, Pitkänen I, Knuutinen J. Melting behaviour of D-sucrose, D-glucose and D-fructose. *Carbohydr Res.* 2004; 339(13): 2267-73. Doi: 10.1016/j.carres.2004.06.022
32. Lee JW, Thomas LC, Schmidt SJ. Can the thermodynamic melting temperature of sucrose, glucose, and fructose be measured using rapid-scanning differential scanning calorimetry (DSC)? *J Agric Food Chem.* 2011; 59(7): 3306-10. DOI: 10.1021/jf104852u
33. Pigman W, Wolfrom M. Advances in Carbohydrate Chemistry. Volume 4. New York: Academic Press Inc; 1949.