

Producción de Riboflavina (Vitamina B₂) por *Ashbya gossypii* ATCC 10895.

JAKELINE LARA¹, JOSÉ CRISPIN SANCHÉZ¹ Y JUAN MANUEL AMARO².

¹Postgrado de Biotecnología de Microorganismos, Laboratorio de Fermentaciones, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ² Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

RESUMEN

Con el objeto de producir riboflavina se estudió el microorganismo *Ashbya gossypii*, el cual se hizo crecer en cultivo sumergido en un fermentador de 10 litros, obteniéndose 0.125 µgs de riboflavina por ml. Al finalizar el tiempo de fermentación, el medio de cultivo se filtró y el filtrado se secó en estufa a 30°C, la vitamina contenida en el producto seco se extrajo con butanol. La vitamina obtenida en forma bruta fue purificada en columna seca de gel de sílice. En el aislamiento en cromatografía en capa fina se obtuvo un Rf de 0.55 tanto para la muestra control (Merk), como para la muestra obtenida de la purificación. En el espectro UV-visible las bandas de absorción del control y de la muestra fueron similares. La biomasa de *A. gossypii* fue analizada obteniéndose 21.5 % en proteínas, 2.5 % en grasas, 5.7 % en cenizas, 0.2 % en calcio y 0.32 % en fósforo.

ABSTRACT

In order to producing riboflavin the microorganism *Ashbya gossypii* was made grow in a fermentator of 10 liters 0.125 µgs was obtained of riboflavin for ml. . The medium of cultivation was filtered and the filtrate was dried in stove to 30° C, the vitamin contained in the product was extracted with butanol. The vitamin obtained in gross form became purified in dry column of silica gel. In the isolation for cromatoghafia in fine layer a Rf of 0.55 was obtained for the sample control (Merck) like for the obtained sample of the purification. In the spectrum UV-visible the bands of absorption of the control and of the sample they are similar. The biomas obtained *A.gossypii* was analyzed being 21.5 % in proteins, 2.5 % in fat, 5.7 % of ashy, 0.2 % of calcium and 0.32 % of match.

PALABRAS CLAVE

Riboflavina, vitamina B₂, fermentación, *Ashbya gossypii*.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a los laboratorios de fermentaciones y de productos naturales de la Facultad de Ciencias y a la planta piloto de insumos biológicos de PROULA por permitir la realización de dicha investigación.

INTRODUCCION

La riboflavina es una vitamina hidrosoluble ampliamente distribuida en el reino vegetal y animal, habiendo sido obtenida por primera vez a partir del suero de leche por Giorgy y colaboradores en 1.933 (Arnold L.Demain, Giancarlo Lancini 1.983). La síntesis de riboflavina por microorganismos puede ser dividida según el grado de acumulación de la vitamina; así, se encuentran sobreproducciones débiles, moderadas y fuertes, tal como la presentan varias bacterias, algunas levaduras y hongos (Presscott, Dunn 1.962). Esta vitamina es de gran importancia terapéutica y alimenticia, es utilizada para el consumo humano, la cual es producida comercialmente por síntesis química, los procesos fermentativos con el empleo de microorganismos, originan la forma que tiene aplicación como suplemento en los piensos concentrados para la alimentación animal, este es un proceso mucho más económico que la síntesis química y no ha sido explotado a cabalidad. Tomando en consideración los elementos anteriormente expuestos, en esta investigación se definieron los siguientes objetivos: (a) seleccionar un medio de cultivo de fácil disponibilidad y económico donde se desarrolle adecuadamente el microorganismo. (b) establecer las condiciones óptimas para la producción de la vitamina B₂ mediante procesos fermentativos sumergidos. (c) purificación y caracterización de la vitamina B₂.

MATERIALES Y MÉTODOS

— Microorganismo:

Para la realización de este trabajo se utilizó la cepa *Ashbya gossypii* ATCC 10895 productora de vitamina B₂, proveniente del cepario de Microbiología Industrial de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes. La cepa utilizada se mantuvo en cuñas de agar M-200.

— Medio de Producción:

Basándonos en los resultados obtenidos a nivel de fioles se incrementó la escala en un fermentador LKB de 10 litros, el cual contenía sacarosa 1.5 %, aceite de maíz 2 %, extracto de malta 0.5 %, extracto de levadura 0.5 %, fosfato diamónico 0.025 %. El pH del medio de cultivo fue de 6.5 este se esterilizó a 121°C por 20 minutos.

— Inóculos:

Los inóculos fueron obtenidos transfiriendo el microorganismo, mantenido en cuñas de agar M-200, primero a 100 ml de medio de producción y después a 1000 ml del mismo medio. En ambos casos la incubación se realizó a 30°C en un agitador orbital a 200 r.p.m durante 24 horas.

— Proceso fermentativo:

Con los valores óptimos obtenidos en volúmenes de 50 ml se estudió la producción de la vitamina en un fermentador LKB de 10 litros. La incubación se realizó a 30°C con aireación (0.4 v.v.m), 7 días de fermentación y sin agitación para evitar que se rompiera el micelio. Cada 24 horas se tomaron muestras, se llevaron a un autoclave y se filtraron. En cada filtrado se determinó la concentración de riboflavina que se midió por espectrofotometría a 445 nm, según método espectrofotométrico reportado por Manzur y Ul-Haque 1.972. Posteriormente en una curva de calibración se obtuvo su concentración. La concentración de azúcares se midió por el método de Antrona (AOAC 1.980).

— Extracción y Purificación de la Riboflavina:

La riboflavina contenida en el producto seco, fue extraída con butanol en embudo de decantación (Sebrell, Harris 1.972), posteriormente se llevó a un rotavapor bajo vacío a 80°C. La purificación se realizó en una columna seca de sílica gel utilizando una mezcla de solventes formada por butanol/etanol/agua en proporción 7:2:1.

— Análisis de Identificación de la Riboflavina:

Estos fueron realizados mediante cromatografía en capa fina, empleando para ello una placa de sílica gel de 10 cm de ancho por 12 cm de largo; una muestra de riboflavina marca Merck fue utilizada como patrón. Otro método de análisis fue la espectroscopía de absorción ultravioleta visible (Silvertein, R. M; Bassler, G. C and Morill, T. C 1.991).

— Caracterización de la Biomasa:

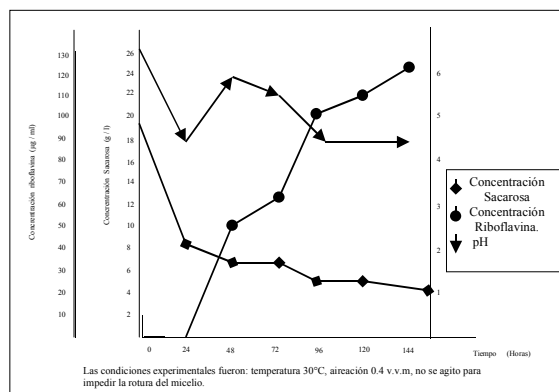
Se determinó el porcentaje de proteínas (Boscan, L 1.982), cenizas (AOAC 1.980), calcio según norma COVENIN 1158-82, fósforo según norma COVENIN 1178-829 y grasa cruda según método gravimétrico reportado por Boscán, L 1.982.

RESULTADOS

1.- Sistema de Fermentador de 10 litros:

En la Figura 1 se sigue el crecimiento mediante la disminución de la sacarosa. Más del 50 % de este azúcar se consumió a las 24 horas. La producción de la vitamina B₂ comienza a las 24 horas y se obtiene un valor máximo de 125 µg/ml a las 144 horas. A las 24 horas de fermentación el pH baja de 6.5 a 4.48 lo que se atribuye al crecimiento del hongo, pues al parecer existe producción de compuestos como el ácido fórmico y el peróxido de hidrógeno (Krapalet, F 1962), a partir de este tiempo y coincidiendo con la detección de riboflavina en el medio, el pH sube de nuevo a 6.5. Posteriormente el pH disminuye de nuevo hasta estabilizarse a pH 4.5 a partir de las 96 horas.

FIGURA 1. PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA EN UN FERMENTADOR DE 10 LITROS

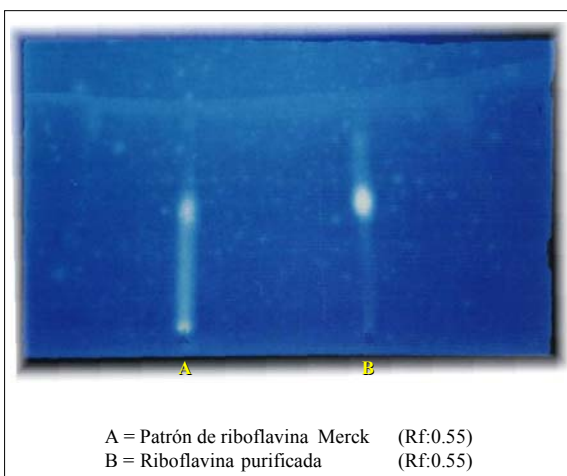


2.- Criterios de Pureza:

El empleo de la cromatografía en columna con sílica gel, no es el método más adecuado si se desea obtener la vitamina altamente pura. La aplicación de la riboflavina para usos terapéuticos requiere de un grado de pureza elevado y de la eliminación de contaminantes que pudieran actuar como agentes pirogénicos o tóxicos. Aunque se está consciente de ambas limitaciones, decidimos emplear este método por su sencillez.

— **Cromatografía en Capa Fina:** en la Figura 2 se observa el recorrido de las muestras. El Rf calculado tanto para la muestra pura (control) como para la purificada en este trabajo fue de 0.55. En ambos casos se observa la fluorescencia característica de esta vitamina.

FIGURA2. CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA DE RIBOFLAVINA

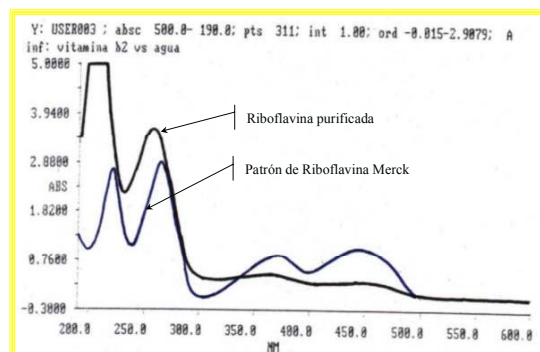


— **Espectroscopía de Absorción Ultravioleta-Violeta:** el espectro de absorción realizado a las muestras en su estado oxidado (Fig.3), indica que hay absorción a 221 nm (vitamina comercial) y a 215 nm (vitamina purificada en este trabajo) podrían corresponder al grupocarbonilo. Las longitudes de ondas de 264 (vitamina comercial) y a 257 nm (vitamina purificada) corresponden a los grupos aromáticos. Los grupos aminos con dobles enlaces unidos a los átomos de carbono absorben a 371 nm (vitamina comercial) y a 355 (vitamina purificada). Las bandas observadas en la región visible a 443 y 442 respectivamente, son características de los compuestos coloreados como la vitamina B₂.

3.- Caracterización de la Biomasa:

La composición de la biomasa obtenida fue de 21.5 % para las proteínas, el contenido de grasa fue de 2.5

FIGURA3. ESPECTRO ULTRAVIOLETA VISIBLE DE RIBOFLAVINA



%, el porcentaje de cenizas 5.7 siendo 0.20 y 0.32 % el contenido en calcio y fósforo, respectivamente.

DISCUSIÓN

— Durante la fermentación el medio de cultivo se torna amarillo y tiene un aspecto cremoso que se intensifica a medida que avanza la fermentación, esto se debe a la lisis del micelio y/o a la excreción de la vitamina al medio de cultivo. Algunos autores reportan que el pH aumenta hasta 8 a las 144 horas (Kapalet, F 1.962). Nuestros resultados no coinciden con los de ellos, posiblemente esto esté relacionado con el hecho de que las cepas de *Ashbya* son distintas; en todo caso el pH más bajo (4.5) es beneficioso pues contribuye a disminuir la contaminación bacteriana.

— El rendimiento de la vitamina B₂ en el medio de cultivo fue de 0.125 gramos por litro. Tomando en cuenta que el peso de 1 litro de medio de cultivo sin biomasa fue de 3 g, cada 100 gramos de este producto seco contiene 4.2 g de riboflavina, según este resultado sería factible producir vitamina B₂ mediante procesos fermentativos como el descrito aquí. Los sobrenadantes, después de eliminar el hongo, serían esterilizados y secados. El material seco así obtenido podría utilizarse para enriquecer piensos destinados a la alimentación animal.

— En la cromatografía en papel se observa una mancha que no está presente en la muestra patrón, lo que indica que la muestra de vitamina obtenida en este trabajo no está totalmente pura. Esta mancha pudiera corresponder a la presencia de productos metabólicos excretados por el microorganismo o a trazas de aceite que no fueron totalmente eliminadas por la cromatografía en columna, lo mismo sucede con las diferencias encontradas en el espectro de absorción ultravioleta-visible.

— El contenido de proteínas en la biomasa de *A. gossypii* es superior al que contienen diferentes productos tradicionalmente empleados en la

alimentación animal: maíz 8.8 %, trigo 11.9 %, sorgo 10.9 % y cebada 11.6 % (Concellon, M. Antonio 1.980). La cantidad de nutrientes que requieren los alimentos para ganado es muy variable y va a depender de la fase fisiológica en que se encuentre el mismo. De acuerdo a la composición de la biomasa obtenida a partir del hongo y a su contenido en vitamina B₂, esta podría conformar un complemento proteico adecuado para dietas de animales mono y poligástricos.

CONCLUSIONES

- 1.- La producción de biomasa y de riboflavina a partir de *A. gossypii* es máxima bajo las siguientes condiciones óptimas: sacarosa 1.5 %, extracto de levadura 0.5 %, aceite de maíz 2 %, y pH 6.5. El rendimiento en la producción de riboflavina fue de 0.125 g por litro.
- 2.- La riboflavina pudo extraerse de los medios de cultivo con butanol y los extractos una vez secos fueron la base para la purificación de la vitamina en columnas de silica gel con un eluyente conformado por butanol/etanol/agua (7:2:1).
- 3.- Los análisis parciales de identificación demuestran que el producto obtenido de la fermentación presenta la fluorescencia amarilla-verdosa característica de la riboflavina. En el aislamiento por cromatografía en capa fina se obtuvo un R_f de 0.55 tanto para la muestra control (Merck) como para muestra obtenida de la purificación. En el espectro UV-visible las bandas de absorción del control y de la muestra son similares.
- 4.- La biomasa de *A. gossypii* obtenida de la fermentación contiene: 21.5 % de proteínas, 2.5 % de grasa, 5.7 % de cenizas, 0.2 % de calcio, 0.32 % de fósforo. Estos resultados indican que el producto obtenido puede ser empleado como suplemento nutricional de los piensos para la alimentación animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold L. **Demain and Giancarlo Lancini**. 1983. Industrial aspects of biochemistry and genetics. Plenum press, New York. p. 239.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1980. Official Methods Analysis. 13^a ed. Washington, D.C. USA.
- Boscán, L. 1982. **Leche y derivados**. Manual de Laboratorio. Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes.

Concellon, M. Antonio. 1980. **Nutrición animal práctica**. Editorial Aedos-Barcelona. p. 66-70.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1979. Norma No 1158-82. **Determinación de calcio en alimentos para animales**; Caracas, Venezuela.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1979. Norma No 1178-82. **Determinación de fósforo en alimentos para animales**; Caracas, Venezuela.

Kapralet, F. 1962. **The physiology of riboflavin production by *Eremothecium ashbyii***. J. Gen Microbiology. 29: 403-419.

Manzur Ul-Haque, H. 1972. **Assay of vitamins in pharmaceutical preparations**. London New York. p. 99-112.

Prescott, S. D and Dunn, C. G. 1962. **Microbiología industrial**. 3^a edición. Impreso en España. Aguilar, S.A.

Sebrell, Harris. 1972. **The vitamins**. Volume V. 2^a edición. Academic press. p. 468.

Silverstein, R.M; Bassler, G.C and Morill, T.C. 1991. **Spectronic identification of organic compounds**. 5^a edition. p. 289-315.

The United Stages Pharmacopeia. 1990. **The National Formulary**. INC. Washington. p. 1224-1225