

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

**Facultad de Ciencias Químicas/Kimika Zientzien
Fakultatea**

Grado en Química

TRABAJO FIN DE GRADO

Determinación de la vitamina riboflavina en medios fermentados por bacterias lácticas mediante cromatografía líquida (HPLC) con detector de fluorescencia

Autor/a: Rubén Zulaica Zabaleta

Dirigido por: Miren Ostra Beldarrain y Maria Teresa Dueñas Chasco

San Sebastián, Septiembre de 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. MATERIALES Y PROCEDIMIENTO.....	12
3.1. Cribado de la producción de riboflavina por las bacterias lácticas.....	12
3.1.1. Bacterias.....	12
3.1.2. Medios de cultivo.....	12
3.1.3. Condiciones de cultivo y toma de muestras.....	15
3.2. Obtención de los espectros de excitación y emisión de la riboflavina.....	19
3.3. Diseño del método basado en espectrofluorimetría.....	19
3.4. Diseño del método basado en HPLC.....	20
3.5. Validación del método basado en HPLC.....	22
3.6. Cuantificación de vitamina B ₂ en las muestras.....	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Cribado y toma de muestras.....	24
4.2. Determinación de riboflavina por espectrofluorimetría.....	27
4.3. Determinación de riboflavina por HPLC.....	31
4.3.1. Validación del método basado en HPLC.....	35
4.4. Determinación de riboflavina en las muestras.....	37
4.4.1. Espectrofluorimetría.....	37
4.4.2. HPLC.....	38
4.4.3. Comparación de las concentraciones obtenidas por ambos métodos.....	41
5. CONCLUSIONES.....	43
6. BIBLIOGRAFÍA.....	44

1. RESUMEN

Diversas cepas de bacterias de ácido láctico (BAL) son capaces de sintetizar riboflavina (conocida como vitamina B₂), un nutriente esencial requerido por los humanos. Este hecho implica la presencia de unos genes específicos que codifican las enzimas que llevan a cabo dicho proceso biológico. Estos microorganismos normalmente la emplean para su propio crecimiento y desarrollo; y en muy pocas ocasiones, terminan excretándola al medio de cultivo. La cuestión es que estos casos tan poco frecuentes están suscitando interés en la comunidad científica, ya que fortificando alimentos y dependiendo de la cantidad liberada, estas bacterias pueden ser utilizadas para garantizar la toma de la cantidad diaria recomendada de este compuesto. Por esto, el principal objetivo de este trabajo fue diseñar un método analítico basado en HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia) acoplado a un detector de fluorescencia, para cuantificar riboflavina en medios fermentados por seis cepas BAL. Solo dos de ellas fueron capaces de excretar el analito. Los resultados conseguidos fueron comparados con los que se obtuvieron con otra técnica: la espectrofluorimetría. En lo que al HPLC se refiere, cabe destacar que se crearon tres curvas de calibración utilizando para ese propósito diferentes rangos de concentraciones. Finalmente, en cuanto a la validación, el método diseñado resultó ser lineal, sensible y selectivo. Además, se evaluaron cuatro parámetros de calidad más: los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), la repetitividad (desviación estándar relativa, RSD %) y la exactitud mediante un test de recuperación.

1. SUMMARY

Several lactic acid bacteria (LAB) strains are able to synthesize riboflavin (known as B₂ vitamin), an essential nutrient required by humans. This fact implies the presence of some specific genes which encode all the enzymes that carry out this biological process. These microorganisms usually use it for their own growth and development and on very few occasions end up excreting it into the culture medium. The point is that such uncommon cases are awakening interest in the scientific community, because depending on the amount released, these bacteria can be used to ensure that people get the recommended daily intake of this compound, by means of food fortification. That is the reason why the main objective of this project was to design an analytical method based on HPLC (High Performance Liquid Chromatography) coupled with a fluorescence detector, in order to

quantify riboflavin in culture media fermented by six LAB strains. Only two of them performed the analyte excretion. The results were compared to those obtained by another technique: spectrofluorimetry. As far as the HPLC is concerned, it should be pointed out that three calibration curves were made using for that purpose different concentration levels. Finally, regarding the validation, the method proved to be linear, sensitive and selective. Furthermore, four more figures of merit were assessed: limits of detection and quantification (LOD and LOQ), repeatability (relative standard deviation, RSD %) and accuracy via a recovery test.

2. INTRODUCCIÓN

La riboflavina forma parte del complejo vitamínico B, siendo, dentro de este grupo, el segundo micronutriente esencial que se descubrió. Esta es la razón por la que también se le conoce como vitamina B₂.¹ Está presente en diferentes clases de alimentos, como por ejemplo: productos que pueden ser de consumo diario (leche, huevos, cereales), verduras, carnes...²

Su estructura química está compuesta por la 7,8-dimetil-isoaloxacina (flavina) unida a una cadena lateral de ribitilo en la posición N10 (véase Figura 1).¹ Tal y como se puede apreciar en la ilustración, la isoaloxacina es un compuesto policíclico, formado por un anillo de benceno que está fusionado con un derivado de la pteridina que contiene dos grupos carbonílicos.

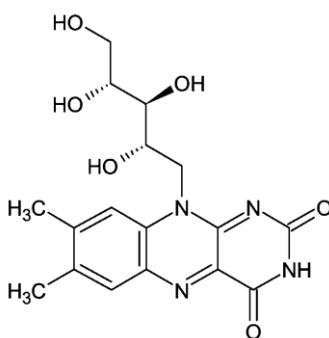


Figura 1: Estructura química de la riboflavina. Modificado de la referencia número 3.

Un aspecto que hay que tener en cuenta, sobre todo de cara a trabajar en el laboratorio, son las características físico-químicas que presenta. A continuación, se muestran unas de las propiedades más relevantes:⁴

1. Adquiere un color amarillo-naranja tanto en estado sólido como en disolución.
2. Es soluble en agua pero con ayuda de una pequeña cantidad de base.
3. Es sensible a la luz y a altas temperaturas, formándose productos de degradación, como el lumicromo (LC) o la lumiflavina (LF).
4. Absorbe de manera intensa a cuatro longitudes de onda diferentes (regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético) cuando se encuentra en disolución acuosa. La isoaloxacina es el grupo cromóforo de esta molécula.

5. Es fluorescente. La flavina en este caso también actúa como fluoróforo.
6. Presenta máxima fotoestabilidad a un pH ligeramente ácido (5-6).

Por otra parte, también cabe decir que sus funciones biológicas son de gran interés desde el punto de vista biomédico. Cuando dicho compuesto se encuentra en el interior de la célula, no se conserva tal y como es, ya que suele sufrir diversas modificaciones dando lugar a especies que son biológicamente más activas (llamadas vitámeros). La fosforilación de la riboflavina da como producto el mononucleótido de flavina (FMN) y la subsiguiente adenililación genera el dinucleótido de adenina y flavina (FAD). Ambos derivados actúan como cofactores en una gran variedad de flavoproteínas.¹ Las estructuras de estas coenzimas se detallan en las siguientes imágenes (Figuras 2A y 2B).

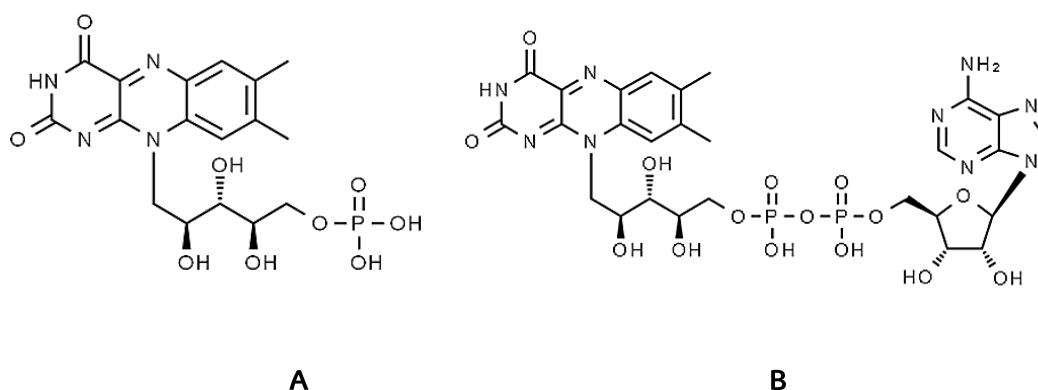


Figura 2: Estructuras químicas del FMN (A) y FAD (B). Modificado de las referencias número 5 y 6.

Estas coenzimas se comportan como transportadoras de electrones en diversas reacciones de oxidación y reducción, participando de esta manera, en el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, proteínas y grasas; la producción de energía, la activación de otras vitaminas como el folato y la piridoxina... El desarrollo y crecimiento del cuerpo y la reparación del ADN son ejemplos de otros procesos (no-redox) en los que están involucradas.^{1,7}

Es precisamente aquí donde radica la importancia y la necesidad de tomar la cantidad diaria recomendada de riboflavina, ya que una posible carencia podría suponer una gran cantidad de efectos negativos sobre la salud. Los seres humanos no poseen la

habilidad de sintetizarla, por lo que, la tienen que adquirir a través de la dieta. No obstante, ciertas plantas y microorganismos sí son capaces de ello.¹

De hecho, actualmente en la industria, se están empleando por ejemplo cepas genéticamente modificadas de *Ashbya gossypii* (un hongo) y *Bacillus subtilis* (una bacteria) para producir riboflavina mediante procesos de fermentación. Esta modificación se lleva a cabo haciendo uso de la ingeniería genética y de análogos químicos como la roseoflavina (véase Figura 3), lo que convierte a estos microorganismos en superproductores.³

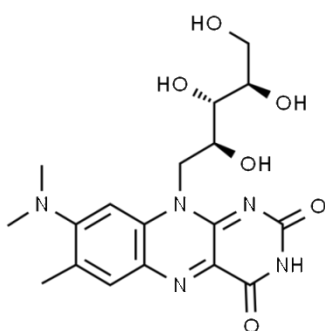


Figura 3: Estructura química de la roseoflavina. Modificado de la referencia número 8.

Otra práctica muy habitual, está siendo la utilización de bacterias de ácido láctico BAL (objeto de estudio en este trabajo) para la fortificación *in situ* de alimentos fermentados (yogures, queso, kéfir...). La fortificación consiste en inocular cepas productoras de vitamina B₂ en matrices alimentarias para producir alimentos fermentados, aumentando su concentración en ella y bio-enriqueciéndolos. De esta manera, se obtienen (algunas BAL actúan como probióticos) alimentos funcionales que satisfacen las demandas nutricionales que existen a día de hoy.^{7,9,10}

Poniendo el foco de atención en estas últimas bacterias, cabe destacar que la información genética y la habilidad que disponen para la biosíntesis de este micronutriente esencial son específicas de cada especie y/o cepa. Además, la organización transcripcional de los genes que codifican las enzimas que catalizan las reacciones implicadas en el proceso (genes *rib*), también varía de una especie a otra. En las situaciones más simples forman un único operón, pero este hecho no se corresponde con todos los casos. En general, para que una cepa sea capaz de sintetizar riboflavina, tiene que poseer en su genoma y se tienen que expresar los 4 genes *rib*:

ribA, *ribG*, *ribH* y *ribB*.^{1, 7} En el siguiente esquema (Figura 4) se muestran las reacciones involucradas en la RBP (*Riboflavin Biosynthetic Pathway*).

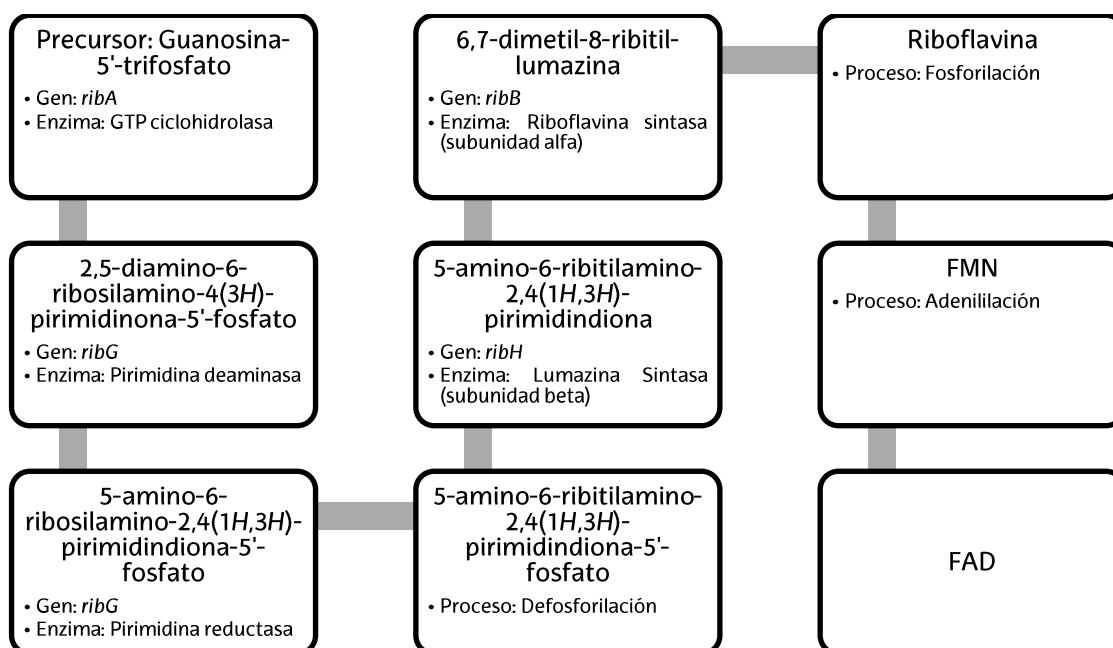


Figura 4: Ruta biosintética de la riboflavina en las BAL (RBP).^{1, 7}

Otro precursor es la ribulosa-5-fosfato, que por acción de la 3,4-DHBP (dihidroxi butanona fosfato) sintasa se convierte en 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato. La enzima está codificada por el gen *ribA*. Este producto entra en la ruta participando en la etapa correspondiente a la síntesis de la lumazina.^{1, 7}

Estas bacterias utilizan la riboflavina para su propio crecimiento y desarrollo, pero si sintetizan una gran cantidad se puede dar el caso de que la excreten. Además, son capaces de absorberla empleando unos transportadores determinados.¹

La excreción es el aspecto que más interesa desde el punto de vista de las aplicaciones biotecnológicas que presentan. Por ello, es necesario el diseño de métodos analíticos que sean capaces de determinar el contenido extracelular de riboflavina, para así evaluar si una cepa es apta o no para fortificar un alimento.

Una de las técnicas más comunes para este propósito es la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia.^{2, 11} Este tipo de cromatografía consiste en hacer pasar (mediante una bomba) un disolvente (fase móvil o eluyente) a alta presión a través de una columna que contiene partículas (fase estacionaria) cuyo diámetro se encuentra entre 3 y 10 μm . Cuanto más pequeño sea el tamaño de estas partículas, más eficaz será la columna, pero mayor será la resistencia al flujo.¹²

Un aspecto importante a tener en consideración es la fuerza del eluyente, la cual es una medida de la capacidad de un disolvente dado para eluir compuestos que han quedado retenidos en la columna. Dependiendo de las características químicas de las dos fases descritas, se pueden distinguir dos subclases de cromatografías.¹²

Por un lado, está la cromatografía de fase normal, en la que la fase estacionaria es polar y la fase móvil es menos polar o apolar. En esta situación, la fuerza aumenta con la polaridad. Por otro, está la de fase inversa (es la que se utiliza en este caso para la riboflavina), donde la columna está constituida de un material no polar y el eluyente presenta un carácter polar. Aquí, dicha fuerza disminuye con la polaridad.^{11, 12, 13}

Además, si en este último subtipo, se usa un eluyente compuesto por un disolvente orgánico y una disolución tampón o agua (muy común cuando se trabaja con estas clases de vitaminas), su capacidad de elución aumentará a la hora de aumentar la proporción del compuesto orgánico. Cuando la fase móvil tiene una composición fija se dice que el proceso se lleva a cabo en condiciones isocráticas. Por el contrario, si va variando de forma gradual, se trata de una elución en gradiente.^{11, 12, 13}

En el HPLC, también se suele utilizar una precolumna, que posee la misma fase estacionaria que la columna analítica y se coloca delante de ésta, ya que así la protege de contaminantes que se retienen de manera irreversible. Otro elemento a destacar es la válvula de inyección que permite introducir la muestra. También hay cromatógrafos en los que el muestreo está automatizado.¹² En la Figura 5, se muestran los diferentes componentes que tiene un equipo de HPLC.

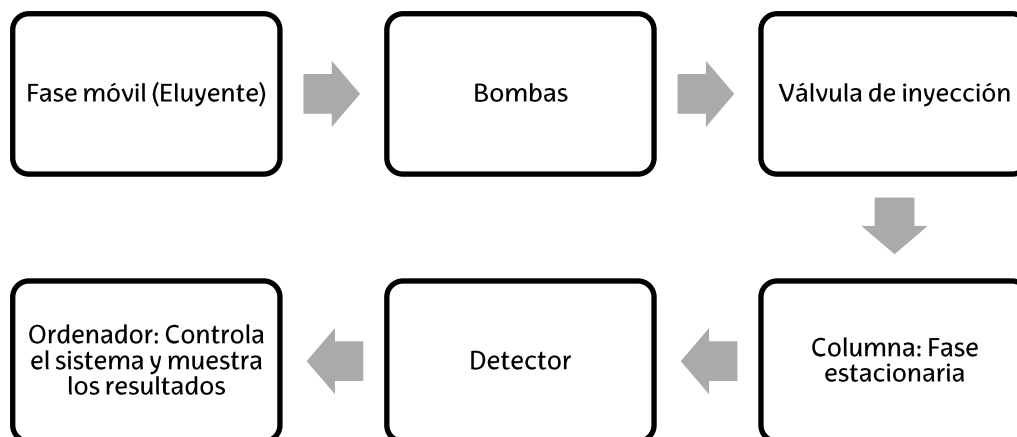


Figura 5: Partes de un sistema HPLC.¹²

Existen muchas formas para detectar un analito determinado (unas más comunes que otras), desde absorción ultravioleta hasta detectores electroquímicos y de fluorescencia, pasando por los de índice de refracción. Los de fluorescencia en general son poco frecuentes. Excitan el eluato con un láser y miden la radiación que emite la molécula a una longitud de onda específica (normalmente la de su máxima emisión). Son extremadamente sensibles y altamente selectivos, ya que responden sólo a compuestos que presentan este tipo de luminiscencia.¹² Por otra parte, cabe destacar que la misma técnica se puede utilizar de una forma más general, para cuantificar no sólo la vitamina B₂, sino también sus vitámeros (FMN y FAD) así como algunas de las formas nativas de otra vitamina (como por ejemplo la piridoxina) en leche y productos lácteos.^{13, 14}

Otra alternativa de la que se hace uso con gran frecuencia para distintas clases de matrices, es la fluorimetría. De hecho, se ha aplicado recientemente dicho método para saber la concentración del analito en cuestión en fórmulas para lactantes, extrayéndolo previamente mediante una MISPE (*Molecularly imprinted solid-phase extraction*), en la que polímeros de impresión molecular actúan como agentes sorbentes.²

Cabe mencionar de la misma manera, que se ha propuesto también el empleo de electroforesis capilar, métodos electroquímicos o ensayos basados en el crecimiento microbiológico.^{2, 11, 13} Por ejemplo, con referencia a los segundos, se han desarrollado

biosensores de ADN con el fin de aplicarlos en suplementos alimenticios y en yemas de huevo de gallina. En estos dispositivos, la vitamina B₂ se une a fragmentos de doble hebra que están fijados a la superficie de un electrodo por medio de una capa de carboxifenilo. El procedimiento se basa en monitorizar la señal de la corriente de reducción del compuesto. Los electrones se transfieren a través de las cadenas de ácido desoxirribonucleico.¹⁵

Finalmente, con estos antecedentes, los objetivos principales del trabajo fueron:

1. Realizar un cribado de seis cepas de bacterias de ácido láctico (de diverso origen) para evaluar su crecimiento, su producción de riboflavina y su capacidad de excreción de la misma en diferentes medios de cultivo.
2. Diseñar dos métodos analíticos, uno basado en espectrofluorimetría y otro en HPLC, con el fin de confirmar la presencia y determinar el contenido extracelular de la vitamina B₂, en los medios fermentados por las bacterias mencionadas.
3. Estudiar y comparar los resultados obtenidos por ambos métodos, con el propósito de decidir cuál de los dos es el más selectivo para cumplir con los objetivos establecidos.
4. Validar el método correspondiente al HPLC teniendo en cuenta diferentes parámetros de calidad.

3. MATERIALES Y PROCEDIMIENTO

Antes de nada, cabe destacar que en todo momento que se trabajó con la riboflavina, se evitó su exposición a la luz, ya sea apagando las luces o cubriendo los matraces con papel de aluminio.

3.1. Cribado de la producción de riboflavina por las bacterias lácticas

3.1.1. Bacterias

Las seis cepas de bacterias de ácido láctico que se estudiaron fueron proporcionadas por la Dra. María Teresa Dueñas Chasco, siendo previamente incubadas en el medio de cultivo MRS (diseñado por De Man, Rogosa y Sharpe en 1960¹⁶) a 28°C y en una estufa de incubación con un 5% de CO₂. A continuación, se muestran las características más relevantes de cada una de ellas, tales como la fuente a partir de la cual fueron extraídas y a qué especie pertenecían (Tabla 1).

Tabla 1: Especie y origen de cada BAL.

Cepa	Especie	Origen
SN6 (productora de Exopolisacáridos)	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Sidra natural
E11	<i>Lactobacillus mali</i>	Mosto de manzana
L1	<i>Lactobacillus sp.</i>	Mosto de manzana
E51	<i>Lactobacillus sp.</i>	Mosto de manzana
L8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Masa madre
SN6 X	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Derivada de SN6

3.1.2. Medios de cultivo

Se usaron tres medios de cultivo para llevar a cabo el cribado: BD Difco™ *Riboflavin Assay Medium* (comercial)¹⁷, medio químicamente definido CDM¹⁶ y medio químicamente definido modificado PID¹⁸. La composición de los tres se muestra en las siguientes tablas (véanse Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 4) acompañadas de los detalles de su preparación.

Para preparar el medio BD (Tabla 2), se pesan de forma general 4,8 gramos y se disuelven en 100 mL de agua destilada. La mezcla se calienta un poco en una placa calefactora hasta su completa homogenización (su pH está en torno a 6,8). Por último, el medio se esteriliza. Dicha esterilización se puede llevar a cabo mediante dos maneras. Una por autoclave a 121 °C durante 12 minutos y la otra por filtración (0,45 μm). En el primer caso, el medio se carameliza ya que tienen lugar las reacciones de Maillard (se inician por la condensación entre los grupos carbonilo de azúcares reductores y los grupos amino de proteínas, péptidos y aminoácidos).¹⁹ En este trabajo, para las cepas SN6, E11, E51 y L1 se utilizó el esterilizado por autoclave y para el resto, el que estaba por filtración.

Tabla 2: Composición del medio BD Difco por litro.¹⁷

Compuestos	Cantidad (en miligramos)	Compuestos	Cantidad (en miligramos)	Compuestos	Cantidad (en miligramos)
Dextrosa	$20,0 \times 10^3$	MgSO ₄	$0,4 \times 10^3$	Piridoxina HCl	4,0
Acetato sódico	$15,0 \times 10^3$	Adenina sulfato	20,0	Piridoxal HCl	4,0
Ácidos Casamino	$10,0 \times 10^3$	Guanina HCl	20,0	Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	2,0
K ₂ HPO ₄	$1,0 \times 10^3$	Uracilo	20,0	Pantotenato de calcio	$800,0 \times 10^{-3}$
KH ₂ PO ₄	$1,0 \times 10^3$	Xantina	20,0	Ácido fólico	$800,0 \times 10^{-3}$
L-Asparagina	$0,6 \times 10^3$	FeSO ₄	20,0	Ácido nicotínico	$800,0 \times 10^{-3}$
DL-Triptófano	$0,2 \times 10^3$	MnSO ₄ ·xH ₂ O	20,0	Tiamina HCl	$400,0 \times 10^{-3}$
L-Cistina	$0,2 \times 10^3$	NaCl	20,0	Biotina	$1,0 \times 10^{-3}$

Con respecto al medio PID, tal y como se puede observar en la Tabla 3, hay cinco disoluciones diferentes que se preparan por separado y después se mezclan: vitaminas (50mL de volumen total), aminoácidos (100mL), bases nitrogenadas (10 mL de NaOH 0,1 M), sales o medio base (690 mL, con un pH de 5,5) y fuente de carbono (100 mL). Si no se especifica lo contrario, como disolvente principal se utiliza agua destilada. Las tres primeras se esterilizan por filtración (0,45 μm) y las dos últimas de forma independiente por autoclave a 121°C durante 12 minutos. El asterisco (*) significa que es opcional añadir estos compuestos al medio.

Tabla 3: Composición del medio de cultivo PID, para un litro.¹⁸

Compuestos	Cantidad que hay que pesar (en gramos)	Compuestos	Cantidad que hay que pesar (en gramos)
VITAMINAS		Metionina	0,1250
Ca-D-pantotenato (B5)	0,0010	Fenilalanina	0,2750
D-biotina (B7)	0,0025 (se disuelven en 2,5 mL de agua con 0,2 g de NaOH)	Prolina	0,6750
Ácido fólico (B11)	0,0010 (se disuelven con la biotina)	Serina	0,3400
Ácido lipoico	0,0010 (se disuelven en 300 µL de etanol absoluto)	Treonina	0,2250
Ácido nicotínico	0,0010	Valina	0,3250
Ácido	0,0100	Asparagina	0,3500
D-aminobenzoico		Glutamina	0,3900
Piridoxamina HCl	0,0050	Triptófano	0,0500
Piridoxina HCl (B6)	0,0020	*Tirosina	0,2500 (se disuelven en 50 mL con 0,1 g de NaOH)
Tiamina HCl (B1)	0,0010		
Vitamina B12	0,0010	BASES NITROGENADAS	
*Riboflavina (B2)	0,0010 (se disuelven en 10 mL de NaOH 0,2M)	Adenina	0,0100
AMINOÁCIDOS		Guanina	0,0100
Alanina	0,2400	Uracilo	0,0100
Arginina	0,1250	Xantina	0,0100
Ácido aspártico	0,4200	MEDIO BASE	
Cisteína HCl	0,1300	K ₂ HPO ₄	1,0000
Ácido glutámico	0,5000	KH ₂ PO ₄	5,0000
Glicina	0,1750	Acetato de sodio	1,0000
Histidina	0,1500	Citrato de amonio	0,6000
Isoleucina	0,2100	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1000
Leucina	0,4750	MnSO ₄ ·xH ₂ O	0,0500
Lisina	0,4400	FUENTE DE CARBONO	
		Glucosa	20,0000

Por último, en el caso del medio CDM (Tabla 4), cabe decir que el volumen total de las disoluciones y las condiciones de elaboración y de esterilización son muy similares al medio anterior. La única diferencia es que a la solución basal se le añaden además tres micronutrientes con sus correspondientes concentraciones: CuSO₄·x5H₂O (1,5x10⁻⁵ g/L), FeSO₄·x7H₂O (2x10⁻⁴ g/L) y ZnSO₄·x7H₂O (1,35x10⁻⁴ g/L).

Tabla 4: Composición del medio de cultivo CDM, para un litro.¹⁶

Compuestos	Cantidad que hay que pesar (en gramos)	Compuestos	Cantidad que hay que pesar (en gramos)
VITAMINAS		Leucina	0,2000
Ca-D-pantotenato (B5)	0,0020	Lisina	0,2500
D-biotina (B7)	0,0020	Metionina	0,1500
Ácido fólico (B11)	0,0020	Fenilalanina	0,2000
Colina HCl	0,0020	Prolina	0,5000
Ácido nicotínico	0,0020	Serina	0,4000
Ácido D-aminobenzoico	0,0001	Treonina	0,3500
Piridoxina HCl (B6)	0,0020	Tritófano	0,2000
*Riboflavina (B2)	0,0010	Valina	0,2000
Tiamina HCl (B1)	0,0010	*Tirosina	0,2000
Vitamina B12	0,0001		
AMINOÁCIDOS		BASES NITROGENADAS	
Alanina	0,2000	Adenina	0,0100
Arginina	0,7500	Timina	0,0100
Asparagina	0,1500	Guanina	0,0100
Ácido aspártico	0,3500	Uracilo	0,0100
Cisteína HCl	0,2000	Xantina	0,0050
		SOLUCIÓN BASAL	
Ácido glutámico	0,5000	K ₂ HPO ₄	1,0000
Glutamina	0,2000	CaCl ₂	0,4400
Glicina	0,5000	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1000
Histidina	0,5000	MnSO ₄ ·xH ₂ O	0,1000
		FUENTE DE CARBONO	
Isoleucina	0,2000	Glucosa	20,0000

3.1.3. Condiciones de cultivo y toma de muestras

Para poder observar la capacidad de excreción de riboflavina se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Partiendo de cultivos en el medio complejo MRS, inocular cada cepa en medios menos ricos en nutrientes con una concentración aproximada de riboflavina de 0,001 g/L (así, con este cultivo, se aseguró el crecimiento de las bacterias).
2. Partiendo de los anteriores (1), inocular cada cepa en medios carentes de esta vitamina para evaluar el crecimiento sin ella.

En la Figura 6 se muestra el protocolo general que se siguió y posteriormente, se especifican las condiciones del proceso:

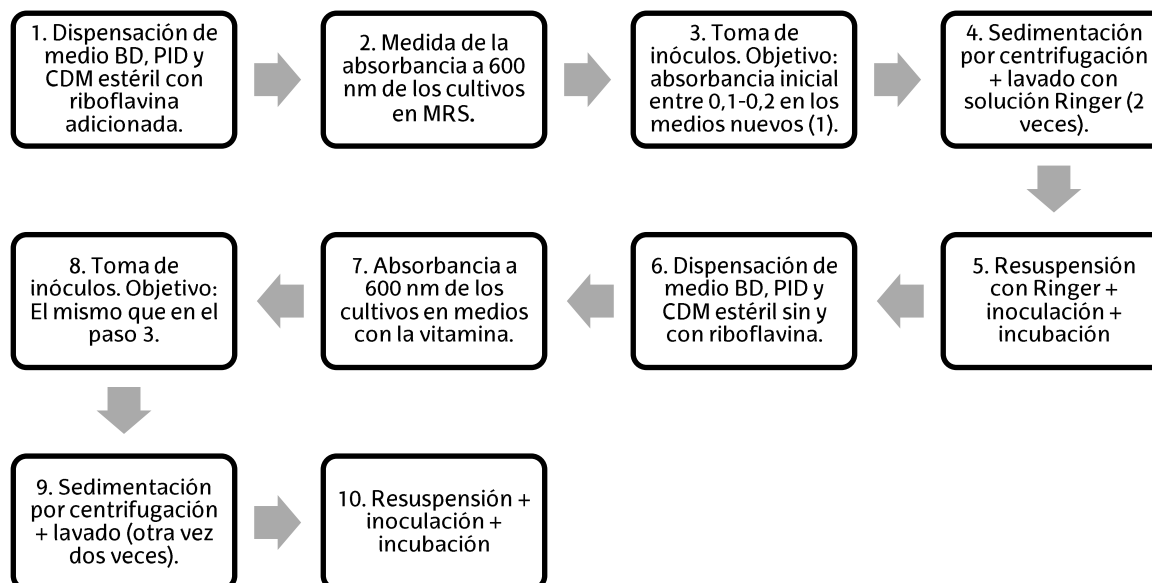


Figura 6: Protocolo general resumido.

1. Primer ensayo. Crecimiento de las bacterias en los medios BD (comercial) y químicamente definidos (CDM y PID) con riboflavina.

- Se dispensó medio BD, PID y CDM sin riboflavina en seis tubos de ensayo esterilizados por autoclave (dos tubos por medio y 9,90 mL en cada uno). Posteriormente, se añadió 0,1 mL de un patrón de vitamina B₂ (se preparó tal y como se indica en la Tabla 2) previamente filtrado (volumen total en cada tubo: 10mL). En algunas ocasiones se modificó el volumen total a 5 mL según la cantidad de medio de la que se disponía. Dichos tubos se almacenaron a 4°C en el frigorífico.
- Se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm de los cultivos en MRS en su fase exponencial de crecimiento (tras un tiempo de incubación de 48 horas en la mayoría de los casos), mediante el espectrofotómetro Helios de ThermoSpectronic (Figura 7).



Figura 7: Espectrofotómetro de absorbancia UV-visible utilizado en el laboratorio.

- A varios tubos de microcentrífuga se añadió el volumen de cultivo necesario para conseguir en los medios nuevos (BD, PID y CDM) una absorbancia inicial que estuviera comprendida entre 0,1 y 0,2.
 - Los inóculos se sedimentaron centrifugándolos durante 8 minutos a 10000 revoluciones por minuto (rpm) a 20°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 1 mL de solución Ringer de la marca comercial Oxoid (se disolvió una tableta en 500 mL de agua destilada esterilizando después la mezcla por autoclave durante 15 minutos a 121 °C). Se volvió a repetir el mismo paso.
 - Finalmente, dichos inóculos fueron sedimentados de nuevo bajo las mismas condiciones de centrifugación, se les quitó el sobrenadante, se resuspendieron en la mínima cantidad de solución Ringer y se procedió a su inoculación en los tres medios.
 - Las bacterias se incubaron durante 48 horas a 28°C, en una estufa de incubación con un 5% de CO₂ y en completa oscuridad.
 - Todo se llevó a cabo en entorno estéril.
2. Segundo ensayo. Crecimiento de las bacterias en los medios BD (comercial) y químicamente definidos (CDM y PID) en presencia y en ausencia de vitamina B₂.
- Se aplicó el protocolo anterior a la nueva situación siguiendo los mismos pasos, pero en lugar de dos tubos de ensayo para cada medio, se prepararon cuatro: dos con riboflavina, que sirvieron como control positivo y dos sin ésta, de los que se cogieron muestras una vez cultivadas las bacterias para la cuantificación

de la posible vitamina B₂ excretada. Por ello, estos dos últimos tubos se protegieron de la acción de la luz con papel de aluminio con el fin de evitar la degradación del analito de interés.

Sin embargo, dependiendo de las características de la cepa y la disponibilidad de tiempo y de medios que había en su momento, se tuvieron que hacer algunas modificaciones al procedimiento general:

- La cepa *L. plantarum* L8 adquiere la fase exponencial de crecimiento en 24 horas. Por esto y por falta de tiempo, no se consiguió registrar la DO a 600 nm en dicha fase. Además, se llevó a cabo un ensayo extra, inoculando otra vez las bacterias provenientes del segundo en los medios de interés sin dicha vitamina.
- A lo que a la estirpe L1 se refiere, cabe decir que Ana Isabel Puertas González proporcionó (aparte de los que ya se tenían) cultivos en medio PID sin riboflavina. Se habían realizado anteriormente cinco ensayos con dicho medio. Se prosiguió con el sexto.
- Por último, en cuanto a *L. collinoides* SN6 X, al observar que en el primer ensayo no crecía de forma significativa en medio CDM y al no tener suficiente medio PID, se continuó con el segundo ensayo empleando exclusivamente medio BD.

Por otra parte, para la toma de muestras se siguieron estos pasos:

- Primero, se midió la absorbancia a 600 nm de los diferentes cultivos en los medios BD, PID y CDM (todos ellos sin riboflavina adicionada).
- Después, se tomaron alícuotas de 1,5 mL repartiéndolas en tubos de microcentrífuga. Toda la materia sedimentable se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos a 20°C. El sobrenadante (la muestra) se almacenó en otros tubos de microcentrífuga, los cuales se etiquetaron de forma adecuada y se guardaron en el congelador en completa oscuridad. Por otra parte, en todos los casos en los que hubo control positivo también se registró la densidad óptica.
- Se tomaron un total de 15 muestras, siendo éstas los sobrenadantes de los cultivos de las cepas:
 - a) SN6, E11, L1 y E51 ($3 \times 4 = 12$).

- b) L1 (sexto pase) y L8 (tercer pase). Ambos en medio PID (2). Con respecto a ésta última, no se consideraron el resto de cultivos ya que no hubo un crecimiento significativo.
- c) SN6 X en medio BD (1).

3.2. Obtención de los espectros de excitación y emisión de la riboflavina

Se procedió a realizar un barrido del espectro de luz ultravioleta-visible de la vitamina B₂, para así, determinar las longitudes de onda de máxima absorción y emisión y poder detectar dicho compuesto en el posterior análisis. Para tal fin, se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse de Agilent Technologies (Figura 8) y se preparó una disolución de 30 mg/L. Ésta se elaboró disolviendo 0,0015 gramos (de un estándar analítico de Sigma-Aldrich) con el mínimo volumen necesario de NaOH 0,05M. Después, se enrasó hasta el volumen final con agua destilada ajustando el pH a 6,0 con ácido acético glacial y se trasvasó a un vial ámbar (todas las disoluciones madre que se mencionan más adelante se prepararon bajo las mismas condiciones). En el momento del registro, se seleccionó el mayor voltaje posible (sensibilidad) pero teniendo siempre cuidado de que los picos no se salieran de escala (evitando la saturación). Las longitudes de onda obtenidas fueron 450 y 525 nm respectivamente.



Figura 8: Espectrofotómetro de Fluorescencia empleado en el laboratorio. En los posteriores apartados (diseño del método y cuantificación) se empleó el mismo aparato.

3.3. Diseño del método basado en espectrofluorimetría

Para la determinación cuantitativa de la vitamina B₂ en los sobrenadantes almacenados, se crearon tres curvas de calibrado, una para cada medio. Con el

propósito de cumplir con este objetivo, se eligió en el espectrofluorímetro anteriormente mencionado una sensibilidad media (600 voltios) y una longitud de onda de excitación de 450 nm. Se prepararon disoluciones estándar (cuyas concentraciones iban en general desde 0,04 mg/L hasta 4 mg/L) a partir de las correspondientes disoluciones madre, que fueron: 30 mg/L para el medio BD esterilizado por autoclave, 72 mg/L para PID y 92 mg/L para CDM. En las disoluciones *stock*, se utilizó agua destilada como disolvente. En las estándar el disolvente fue el propio medio de cultivo. La finalidad era emular de la forma más fiel posible la matriz en la que se encontraba disuelto el analito en las muestras. Las disoluciones se elaboraron el mismo día de su uso.

Para construir dichas curvas, se registraron los espectros de emisión, uno por cada dilución (se hizo lo propio para las matrices), y se representaron las intensidades fluorescentes a 525 nm frente al contenido de riboflavina expresado en mg/L. Otra alternativa fue representar los respectivos logaritmos. Se eligió la opción que mejor se ajustaba a una regresión lineal. Se realizó un análisis de dichas regresiones mediante *Microsoft Excel* y se calcularon los límites de detección (LOD) estadísticamente (véase Ecuación 1). Después, se modificaron estas curvas teniendo en cuenta que el LOD tiene que ser menor y que 10 veces el LOD debe de ser mayor que la concentración mínima del rango de calibración.²⁰ Por último, se obtuvieron los límites de cuantificación (LOQ), siendo LOQ tres veces LOD.²⁰

$$\text{LOD} = 3,3 * \frac{s_r}{m} \text{ (Ecuación 1)}^{20}$$

Donde s_r es la desviación estándar de la regresión, m es la pendiente y 3,3 es (de acuerdo con la IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*) un coeficiente que implica una probabilidad de cometer falsos positivos o negativos del 5%.

3.4. Diseño del método basado en HPLC

El método se diseñó con la colaboración de Ana Isabel Puertas González. En primer lugar, se preparó una disolución patrón de la vitamina de 50 mg/L. A partir de ésta, se realizó una serie de diluciones (con concentraciones comprendidas entre 0,5 µg/L y 10 mg/L), de tal manera que se tuvieran tres rangos diferentes: uno para concentraciones bajas, otro para medias y el último para altas. Todas ellas se volvieron a elaborar el mismo día de su utilización y en todo momento, como disolvente se empleó agua Milli-

Q ultrapura. Se tomaron alícuotas de 1,5 mL, se filtraron mediante filtros de acetato de celulosa con un diámetro de poro de 0,20 μm y se almacenaron en viales de color ámbar (estos pasos a seguir fueron iguales para la inyección de las muestras y para la validación del método). Las condiciones con las que se operó fueron las que se presentan en la lista:

- Equipo de HPLC Shimadzu-Prominence (Figura 9).
- Detector de fluorescencia Shimadzu-RF 10AXL (Figura 9), con unas longitudes de onda de excitación y emisión de 450 y 525 nm respectivamente.
- Elución isocrática.
- Flujo de 0,8 mL/min.
- Fase móvil constituida por acetato sódico 0,083M: metanol (60:40) con un pH de 6,0 ajustado con ácido acético glacial.
- Fase estacionaria formada por una precolumna Teknokroma TRC-160K1 unida a una columna analítica EC 250/4,6 Nucleosil 120-5 C18 (Macherey-Nagel).
- Tiempo de elución: 10 minutos.
- Para todos los rangos de concentración se empleó una ganancia x4, pero una sensibilidad diferente. Con el rango bajo se utilizó sensibilidad alta, con el medio, media; y con el alto, baja.



Figura 9: Equipo de HPLC que se usó para el análisis, acoplado al detector de fluorescencia descrito.

Para generar las curvas de calibración el volumen inyectado en el cromatógrafo fue de 20 µL, efectuando una única medida de cada dilución (se volvió a hacer lo mismo con las matrices). De los cromatogramas resultantes, se tomaron las intensidades máximas de los picos expresados en milivoltios (respuesta del detector) y se representaron frente al contenido de analito. Las tres curvas creadas se ajustaron a una regresión lineal. El análisis de las regresiones, el cálculo de los LOD y LOQ, y las modificaciones de las rectas se llevaron a cabo como en la espectrofluorimetría.

3.5. Validación del método basado en HPLC

Se calcularon dos parámetros de calidad más. Por una parte, la precisión (mediante la repetitividad), por otro, la exactitud (por medio de un test de recuperación). Para cada curva de calibrado (3 sensibilidades), se tomaron dos concentraciones un tanto alejadas entre sí y que a su vez, se encontraban dentro del rango de calibración.

Para la repetitividad, se prepararon disoluciones con el contenido de riboflavina elegido utilizando agua Milli-Q. Para el test, como disolvente se empleó un medio de cultivo que no contuviera el analito, En este caso se hizo uso del medio CDM. Todas ellas se obtuvieron de forma similar a las del diseño. Cada una se inyectó tres veces.

Una vez inyectadas, se anotaron los valores registrados por el detector de fluorescencia e interpolando, se calcularon las concentraciones medias. También se calcularon las desviaciones estándar y en el caso de la repetitividad, se hizo lo propio con las desviaciones estándar relativas o coeficientes de variación porcentuales (RSD), teniendo en cuenta que:

$$\text{RSD (\%)} = 100 * \frac{\bar{x}}{s} \text{ (Ecuación 2)}^{21}$$

Donde \bar{x} es la concentración media y s la desviación estándar.

Luego, en el test, se calculó el porcentaje de la cantidad que era capaz de cuantificar el método (con respecto a la añadida) dividiendo el producto entre 100 y la concentración media por la concentración adicionada.²¹

3.6. Cuantificación de vitamina B₂ en las muestras

Se descongelaron los sobrenadantes a temperatura ambiente. Para el análisis, en lo que al espectrofluorímetro se refiere, se registró un espectro de emisión por muestra.

Se recogieron los valores de las intensidades fluorescentes a 525 nm. Por otra parte, en cuanto al HPLC, se realizó una inyección de cada una y se anotaron los valores proporcionados por el detector. Para determinar el contenido, se llevaron a cabo interpolaciones mediante las ecuaciones de las rectas obtenidas. Finalmente, se compararon gráficamente las concentraciones que se consiguieron por ambos métodos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cribado y toma de muestras

En este trabajo se ha examinado la capacidad de seis cepas de bacterias lácticas de crecer en medios de cultivo libres de riboflavina, con el fin de analizar la síntesis y liberación de esta vitamina al medio. Para ello, se utilizaron tres medios de cultivo libres de vitamina B₂, y se comparó dicho crecimiento en presencia y en ausencia de dicho compuesto. Se emplearon tres medios, uno de ellos BD Difco (comercial) y los medios denominados PID y CDM (químicamente definidos) se prepararon en el laboratorio.

En la Tabla 5 se proporcionan los valores de densidad óptica final obtenidos para los distintos cultivos que se realizaron.

Tabla 5: Determinación del crecimiento de las cepas de bacterias lácticas. Absorbancias finales a 600 nm (media \pm desviación estándar) de los cultivos de las BAL empleadas, con n = 2 (siendo n el número de medidas).

Medio de cultivo	SN6	E11	L1	E51	L8
MRS	2,7 \pm 0,6	2,89 \pm 0,03	4,77 \pm 0,14	4,24 \pm 0,05	4,3 \pm 0,2
BD DIFCO +	1,04 \pm 0,02	2,50 \pm 0,08	2,8 \pm 0,8	1,9 \pm 0,2	4,48 \pm 0,03
	2,37 \pm 0,02	2,62 \pm 0,13	3,0 \pm 0,3	1,71 \pm 0,10	4,31 \pm 0,06
BD DIFCO -	2,40 \pm 0,04	0,93 \pm 0,05	3,13 \pm 0,09	0,98 \pm 0,05	1,80 \pm 0,09
					0,086 \pm 0,013 ^C
PID +	3,1 \pm 0,4	2,572 \pm 0,015	3,5 \pm 0,3	2,81 \pm 0,03	3,69 \pm 0,06
	3,6 \pm 0,2	2,547 \pm 0,008	3,54 \pm 0,04	2,640 \pm 0,013	3,86 \pm 0,08
PID -	3,5 \pm 0,2	0,89 \pm 0,05	3,40 \pm 0,06	0,80 \pm 0,04	0,506 \pm 0,015
			2,37 \pm 0,08 ^A		1,61 \pm 0,09 ^C
			3,04 \pm 0,07 ^B		
CDM +	0,41 \pm 0,10	1,6 \pm 0,5	1,13 \pm 0,13	2,0 \pm 0,2	2,2 \pm 0,2
	2,11 \pm 0,09	1,93 \pm 0,05	0,693 \pm 0,008	2,0 \pm 0,6	2,04 \pm 0,10
CDM -	1,78 \pm 0,03	1,12 \pm 0,10	1,16 \pm 0,12	0,95 \pm 0,02	0,35 \pm 0,07
					0,040 \pm 0,002 ^C

A y B: quinto y sexto ensayo en ese medio. C: ensayo extra en medios sin riboflavina. Cabe decir que no se disponen de valores de absorbancia para la cepa SN6 X debido a los inconvenientes que hubo (página 18). Por ello, se decidió exclusivamente cuantificar la riboflavina que pudiera excretar dicha cepa.

El signo positivo que acompaña al nombre del medio, hace referencia a que dicho medio contenía riboflavina con una concentración de 0,001 g/L. El signo negativo significa que no tenía. El color rojo oscuro indica que los valores de absorbancia corresponden al control positivo.

Los valores de densidad óptica obtenidos dan una idea de la capacidad de crecimiento y desarrollo que tienen las bacterias en los distintos medios. Hay siempre un medio óptimo (nutrientes, pH...) que es el que mejor se ajusta a sus necesidades biológicas y cuanto mayor es el valor de dicha absorbancia, mayor es en general su crecimiento. Además, al tratarse de bacterias de ácido láctico, al realizar la fermentación provocan una disminución del pH del entorno en el que se encuentran.

Existen cepas que no crecen si se inoculan en medios sin riboflavina y muchas veces sí crecen, es porque siguen teniendo en su interior restos de esta vitamina (proveniente de cultivos anteriores en los que sus respectivos medios sí la contenían). Esto implica la necesidad de llevar a cabo un mayor número de pases en medios libres de vitamina B₂ (de los que en realidad se hicieron). Relacionado con este hecho cabe decir que, durante el protocolo, se procedió a lavar las bacterias dos veces con la solución Ringer, para así, intentar evitar dentro de lo posible el arrastre de dicho compuesto.

Generalmente, si las bacterias crecen en un medio sin riboflavina, significa que tienen en su genoma los cuatro genes *rib* y que probablemente los expresan sintetizándola. Lo que ocurre es que muchas veces, la suelen emplear exclusivamente para su propio desarrollo sin liberarla al exterior.⁷ Dicha liberación suele depender de muchos factores, como por ejemplo: las condiciones en las que se encuentren, las mutaciones que puedan presentar en su ADN...

Teniendo en cuenta, las absorbancias proporcionadas por el espectrofotómetro, que están mostradas en la Tabla 5, se puede ver que:

- Las cepas SN6 y la L1 crecieron bien tanto con riboflavina como sin riboflavina. Los resultados de la primera concuerdan con lo que ya se sabe acerca de ella (es superproductora de la vitamina y tiene el operón *rib*). En el caso de la segunda, los resultados obtenidos sugieren que también posee los cuatro genes *rib*.
- Sin embargo, en el caso de las cepas E11 y E51 los valores de la absorbancia a 600 nm fueron menores en los medios sin riboflavina en comparación a los obtenidos con la vitamina, lo que puede implicar que no sean capaces de sintetizarla.
- El crecimiento de la bacteria L8 en ausencia de la vitamina, es notablemente inferior que en presencia de dicho compuesto, pero aun así, siguió creciendo

después del segundo ensayo en PID negativo (-). Estos resultados podrían ser debidos a la producción de riboflavina.

- Sin tener en cuenta el MRS rico en nutrientes, en términos generales, el mejor medio para el cultivo de las bacterias en estudio fue el medio químicamente definido denominado PID.

A continuación, se muestran imágenes tomadas de los tubos de ensayos finales (Figuras 10, 11 y 12), después del periodo de incubación. No se disponen de ilustraciones con referencia a la cepa SN6 X.

Se puede apreciar a simple vista por el color amarillo del medio de cultivo líquido que la cepa SN6 excretó riboflavina y que por el contrario, la E11 no (Figura 10). En el caso de las cepas E51 y L1 (Figura 11) no se apreció cambio de color en los medios químicamente definidos por lo que ninguna de las dos excretó dicha vitamina. En la Figura 12, tampoco se aprecia liberación de riboflavina al medio. Sin embargo, se puede observar que la cepa L8 no creció de forma significativa en BD Difco ni en CDM.

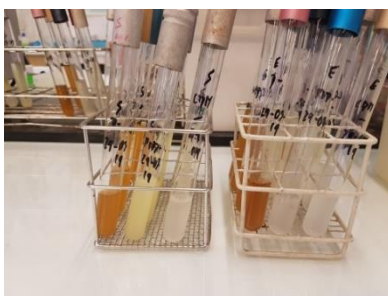


Figura 10: Fotografía de los cultivos de las cepas SN6 (izquierda) y E11 (derecha). El primer medio empezando desde la izquierda es el comercial BD, seguido por PID y terminando con CDM.



Figura 11: Fotografía de los cultivos de las cepas E51 (izquierda) y L1 (derecha). El primer medio empezando desde la izquierda es CDM, seguido por PID y terminando con BD.

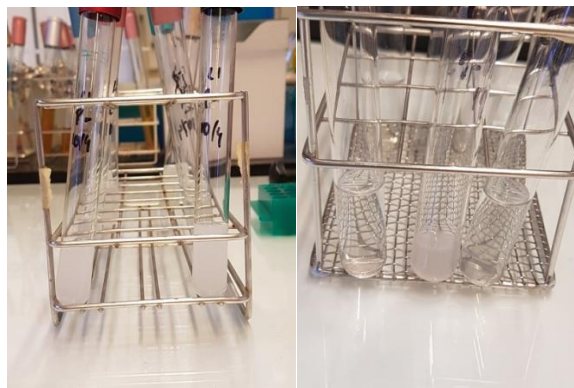


Figura 12: Fotografías de los cultivos de las cepas L1 (imagen de la izquierda, sexto pase en medio PID) y L8 (derecha, tercer pase). En la imagen de la derecha, el primero comenzando desde la izquierda es el medio comercial BD, el segundo es PID y el último CDM.

4.2. Determinación de riboflavina por espectrofluorimetría

En este apartado, se detallan la forma de los espectros conseguidos en los calibrados, las concentraciones de las diluciones empleadas y sus intensidades fluorescentes, así como las rectas obtenidas y sus parámetros más relevantes (Figuras 13, 14, 15 y 16; Tablas 6, 7,8 y 9).

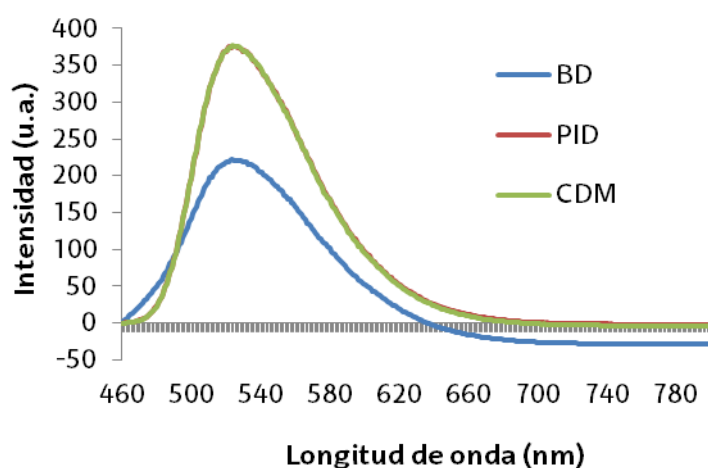


Figura 13: Forma que tienen (para cada medio de cultivo) los espectros de emisión (a 600 voltios) de las disoluciones estándar. En este caso, los espectros corresponden a una concentración de 2 mg/L.

Tabla 6: Concentraciones e intensidades fluorescentes del calibrado para el medio BD.

Concentración (mg B ₂ /L)	Intensidad a 525 nm (u.a.)*
4,005	355,20
3	291,21
2,01	220,22
1,005	144,55
0,75	138,96
0,45	119,21

*(u.a.) = unidades arbitrarias.

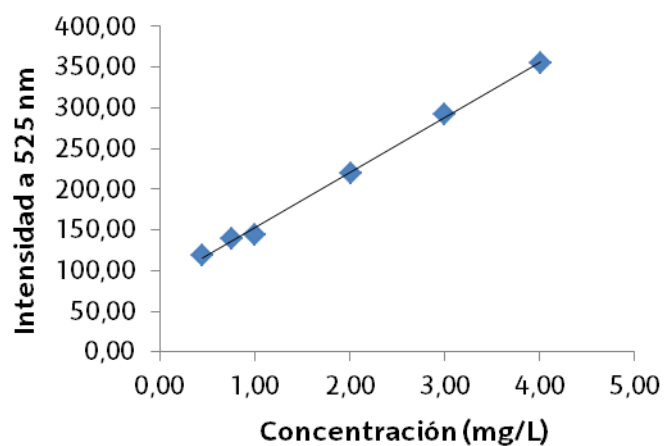


Figura 14: Recta de calibrado para riboflavina en medio BD Difco.

Tabla 7: Concentraciones e intensidades fluorescentes del calibrado para el medio PID.

Concentración en mg B ₂ /L (C _{RIB})	Intensidad a 525 nm en u.a. (I _F)
4,032	652,81
3,024	507,70
2,016	376,05
1,008	210,94
0,756	161,33
0,4536	92,22
0,1512	32,45

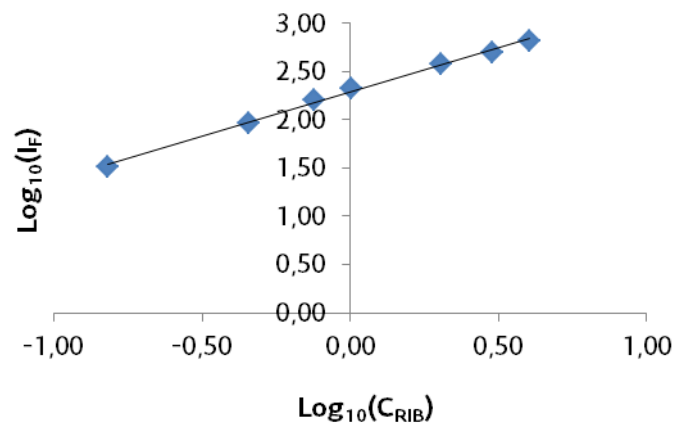


Figura 15: Recta de calibrado para riboflavina en medio PID.

Tabla 8: Concentraciones e intensidades fluorescentes del calibrado para el medio CDM.

Concentración en mg B ₂ /L (C _{RIB})	Intensidad a 525 nm en u.a. (I _F)
4,002	636,69
3,036	531,75
2,024	376,20
0,736	136,02
0,184	42,90
0,092	23,80

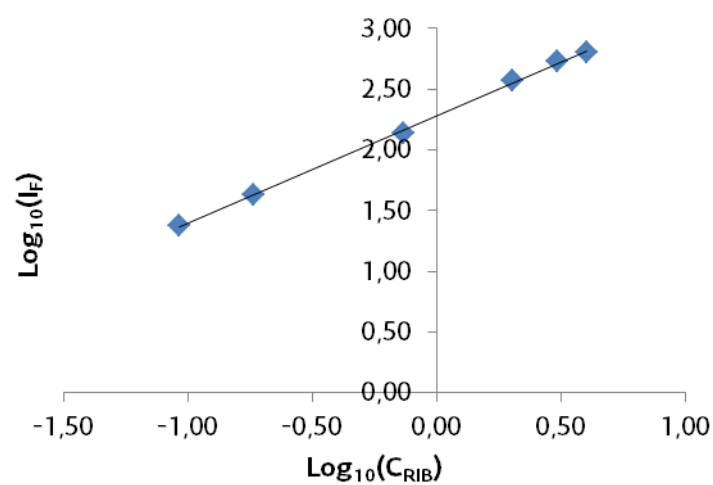


Figura 16: Recta de calibrado para la riboflavina en medio CDM.

Tabla 9: Parámetros de las tres rectas obtenidas por espectrofluorimetría. N es el número de pares de datos y R el coeficiente de correlación de Pearson. $m \pm s_m t_{N-2}$ y $b \pm s_b t_{N-2}$ son los intervalos de confianza de la pendiente y la ordenada en el origen respectivamente.²² Donde m y b son los coeficientes, s_m y s_b las desviaciones estándar y t_{N-2} , la t de Student con N-2 grados de libertad a un nivel de confianza del 95%.

Medio	N	Rango de concentración (mg/L)	$m \pm s_m t_{N-2}$	$b \pm s_b t_{N-2}$	R ²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
BD Difco	6	0,45-4,005	68 ± 5	85 ± 10	0,9976	0,2	0,6
PID	7	0,1512-4,032	0,91 ± 0,06	2,29 ± 0,03	0,9967	0,10	0,30
CDM	6	0,092-4,002	0,88 ± 0,04	2,28 ± 0,02	0,9989	0,08	0,24

Tal y como se puede comprobar, en general, la calidad de la regresiones fue muy buena, con más de un 99,6 % de la variabilidad de los datos explicada. En los medios PID y CDM se obtuvo una mayor linealidad representando los logaritmos. El menor límite de detección se consiguió con CDM.

En lo que respecta al medio de cultivo comercial, cabe destacar que presentaba una interferencia considerable a la misma longitud de onda de análisis (Figura 17), por lo que se procedió a intentar eliminar dicho efecto de la matriz. Esto ocurría con el que estaba esterilizado por autoclave, pero no con el que lo estaba por filtración. Se intentó optimizar el calibrado empleando la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS: *Partial Least Squares Regression*)²³, haciendo uso del análisis multivariable.

Una vez conseguida la recta alternativa, se compararon ambas entre sí, representando en la misma gráfica, la concentración (de las disoluciones estándar) predicha frente a la teórica. Se obtuvieron resultados muy similares. Además, se midieron como muestras independientes, diferentes patrones con concentraciones conocidas, con el objetivo de comparar el error cometido en la determinación del contenido de riboflavina. Se registraron mayores errores con el PLS. Se hizo lo propio con los demás medios, a pesar de que no presentaran un problema de estas características. En este caso, los errores también fueron mayores con el PLS. Debido a todo esto, se decidió que el calibrado de BD Difco no era válido para la cuantificación.

No obstante, a pesar de todo lo comentado anteriormente, cabe decir que la calibración por PLS podría ser una buena alternativa para modelar el medio. Sin embargo, serían necesarias medidas adicionales que no se llevaron a cabo en este trabajo.

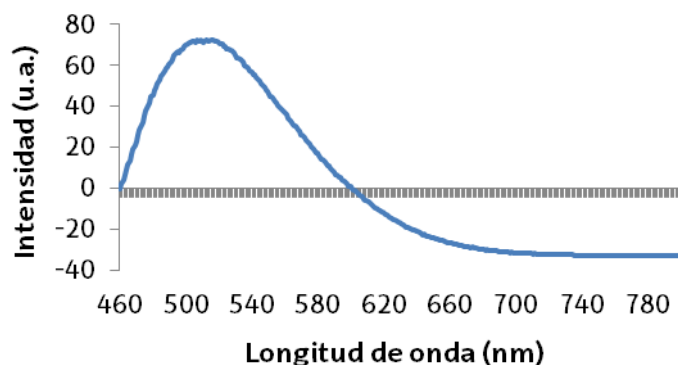


Figura 17: Espectro de emisión del medio BD caramelizado sin analito.

4.3. Determinación de riboflavina por HPLC

Como en el apartado anterior, se presenta toda la información relacionada con las curvas de calibración. Además de esto, se incluye uno de los cromatogramas registrados junto con el tiempo de retención del analito (Tablas 10, 11, 12 y 13; Figuras 18, 19, 20 y 21).

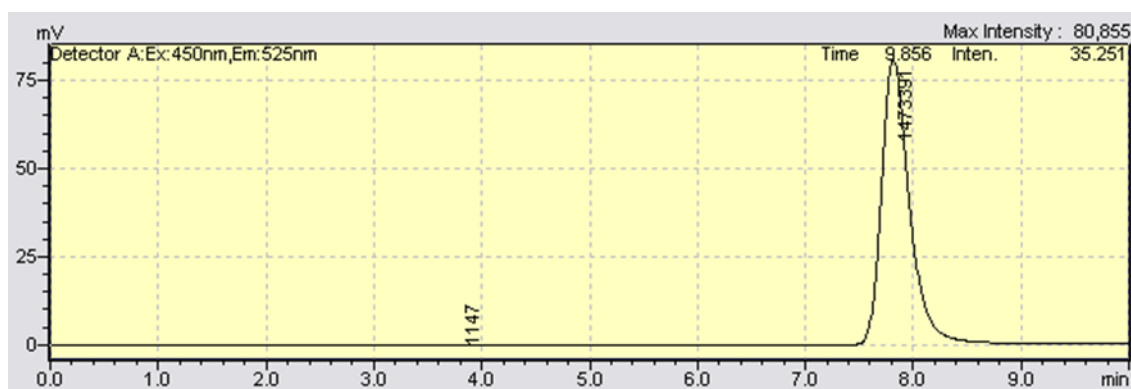


Figura 18: Cromatograma correspondiente a la concentración de 250 $\mu\text{g/L}$ (Sensibilidad media, ganancia x4). Se puede apreciar que con el método utilizado el tiempo de retención para el analito es de 8,0 minutos aproximadamente.

Tabla 10: Concentraciones y respuestas del detector del calibrado para la sensibilidad alta.

Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Respuesta del detector (mV)
5	55,890
10	106,833
20	214,932
50	508,879

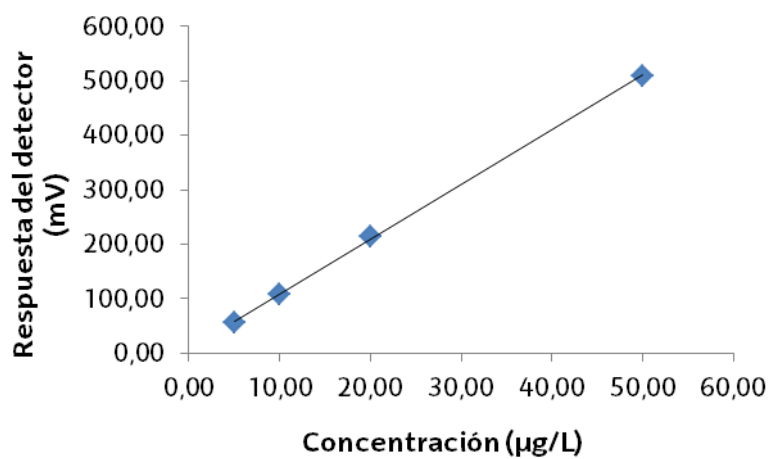


Figura 19: Recta de calibrado para la vitamina B₂ a sensibilidad alta.

Tabla 11: Concentraciones y respuestas del detector del calibrado para la sensibilidad media.

Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Respuesta del detector (mV)
100	26,007
250	80,855
500	166,628
750	234,794
2000	618,960

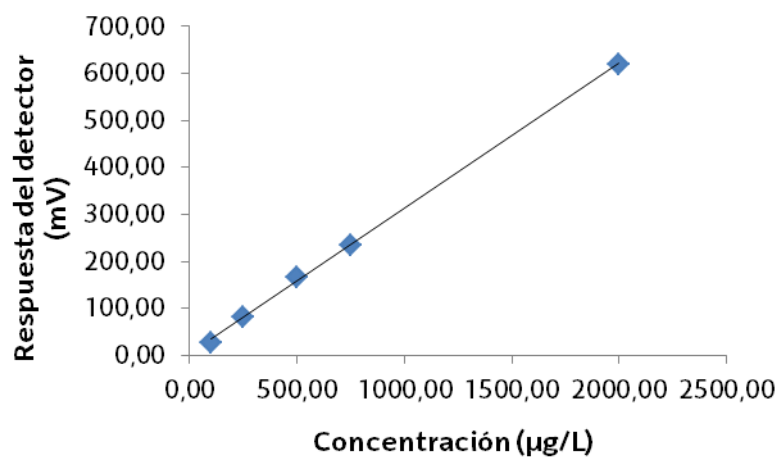


Figura 20: Recta de calibrado para la vitamina B₂ a sensibilidad media.

Tabla 12: Concentraciones y respuestas del detector del calibrado para la sensibilidad baja.

Concentración (mg/L)	Respuesta del detector (mV)
0,5	5,237
1	9,949
4	39,597
6	58,348
8	77,870
10	101,027

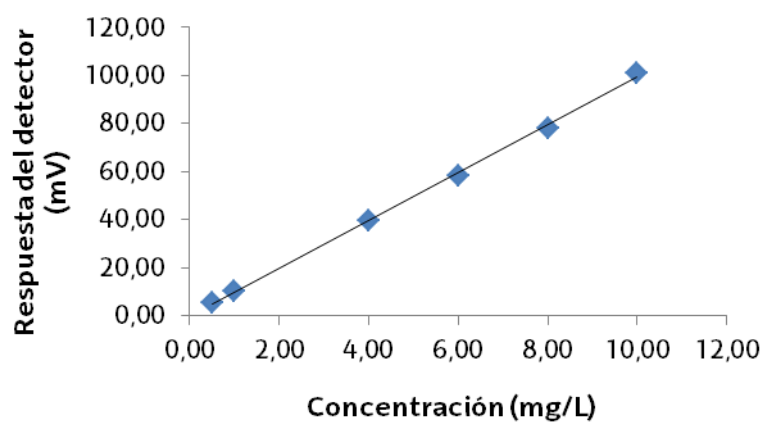


Figura 21: Recta de calibrado para la vitamina B₂ a sensibilidad baja.

Tabla 13: Parámetros de las rectas conseguidas por HPLC.

Sensibilidad	N	Rango de concentración	$m \pm s_m t_{N-2}$	$b \pm s_b t_{N-2}$	R^2	LOD	LOQ
Alta	4	5-50 $\mu\text{g/L}$	$10,0 \pm 0,6$	8 ± 16	0,9996	1,6 $\mu\text{g/L}$	4,8 $\mu\text{g/L}$
Media	5	100-2000 $\mu\text{g/L}$	$0,309 \pm 0,015$	3 ± 15	0,9993	76 $\mu\text{g/L}$	228 $\mu\text{g/L}$
Baja	6	0,5-10 mg/L	$9,9 \pm 0,4$	0 ± 3	0,9990	0,4 mg/L	1,2 mg/L

La calidad de la regresión fue de nuevo muy alta para los tres rangos de concentraciones con más de un 99,90 % de la variabilidad de los datos explicada. El diseño se realizó a tres sensibilidades ya que no todas las bacterias de ácido láctico son capaces de excretar cantidades grandes de riboflavina (son las menos comunes). La mayoría, en caso de hacerlo, lo hacen en muy pequeña cantidad. Por lo tanto, se creó el método teniendo en cuenta esta circunstancia. La mayor linealidad se consiguió con la sensibilidad alta, concentraciones bajas. En cuanto a los medios de cultivo, se vio que tanto el BD esterilizado por autoclave como el esterilizado por filtración presentaban una pequeña señal de fondo (Figuras 22 y 23). Sin embargo, más adelante se observó que se podía eliminar, restándole a las muestras la fluorescencia que presentaba la matriz. Los medios PID y CDM no presentaron interferencia alguna. Por otra parte, en cuanto a los picos que aparecen en los cromatogramas indicados, se desconoce a qué compuestos pertenecen.

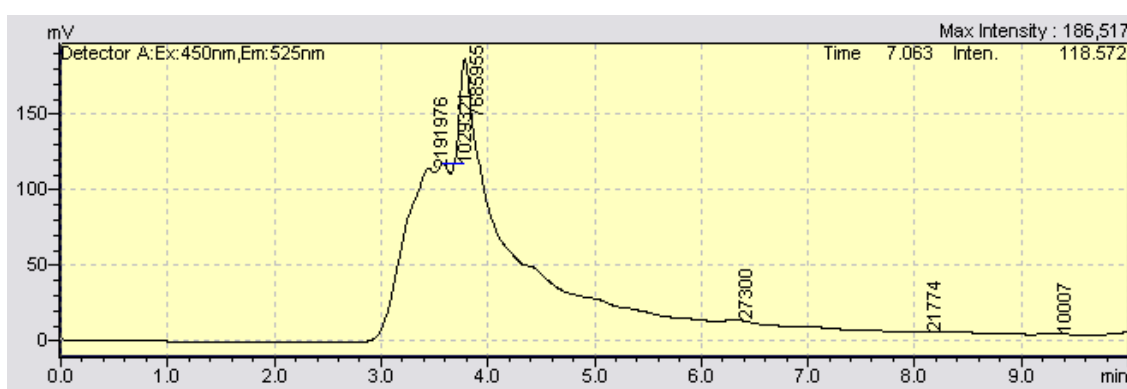


Figura 22: Cromatograma del medio BD Difco sin caramelizar (señal de fondo a 8,0 minutos de 6,416 mV).

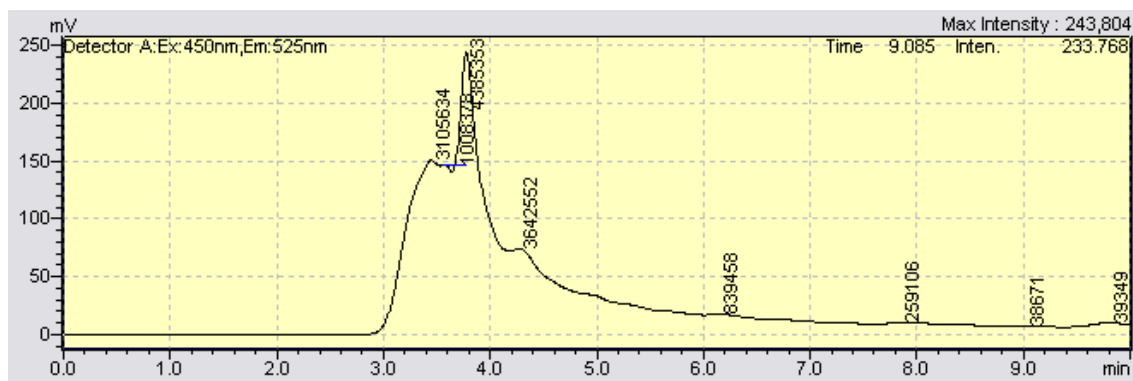


Figura 23: Cromatograma del medio BD Difco caramelizado (Señal de fondo a 8,0 minutos de 9,492 mV).

4.3.1. Validación del método basado en HPLC

Anteriormente, ya se han comentado y evaluado algunos parámetros de calidad del método: la linealidad, la sensibilidad y los límites de detección y cuantificación. Aquí, se discutirán la precisión y la exactitud que se obtuvo para cada rango de concentraciones (Tablas 14 y 15).

Tabla 14: Valores de repetitividad conseguidos para las distintas sensibilidades, expresados como desviación estándar relativa (%). La n indica el número de veces que se ha inyectado cada disolución.

Sensibilidad	Concentración	Respuestas del detector (mV)	Concentración media \pm desviación estándar	Repetitividad (RSD %, n = 3)
ALTA	10,2 μ g/L	164,706	13 \pm 2 μ g/L	15
		133,536		
		128,309		
	40,8 μ g/L	463,847	46,3 \pm 0,8 μ g/L	1,7
		477,190		
		478,066		
MEDIA	208 μ g/L	76,723	243 \pm 3 μ g/L	1,2
		78,491		
		78,549		
	1040 μ g/L	356,855	1167 \pm 19 μ g/L	1,6
		366,969		
		366,925		
BAJA	3,06 mg/L	27,824	2,85 \pm 0,03 mg/L	1,0
		28,289		
		28,329		
	8,16 mg/L	79,295	8,013 \pm 0,017 mg/L	0,2
		79,498		
		79,635		

Tabla 15: Valores de recuperación (%) de la concentración añadida al medio CDM sin analito.

Sensibilidad	Concentración	Respuestas del detector (mV)	Concentración media \pm desviación estándar	Recuperación (%), n = 3
ALTA	10,2 μ g/L	142,988	13,47 \pm 0,06 μ g/L	132
		143,081		
		144,114		
	40,8 μ g/L	469,450	46,2 \pm 0,3 μ g/L	113
		472,260		
		475,965		
MEDIA	208 μ g/L	69,848	216,50 \pm 0,09 μ g/L	104
		69,860		
		69,902		
	1040 μ g/L	358,746	1151,7 \pm 1,2 μ g/L	111
		358,562		
		359,264		
BAJA	3,06 μ g/L	29,436	2,982 \pm 0,009 mg/L	98
		29,330		
		29,505		
	8,16 μ g/L	79,424	7,95 \pm 0,06	98
		78,323		
		78,930		

Si se observan las tablas anteriores, se pueden apreciar ciertas tendencias razonables.²⁴ La imprecisión del método aumentó a medida que se disminuyó la concentración. Con la recuperación ocurrió algo parecido, ya que empeoró cuando bajó el contenido de riboflavina (los errores que se cometieron fueron cada vez mayores).

Por otra parte, para saber si los valores de repetitividad y recuperación eran aceptables, se adoptaron los criterios de aceptación que se muestran en la Tabla 16. Se puede ver claramente que la mayor parte cumplen con dichos criterios. Sin embargo, la recuperación de 10,2 μ g/L, no podría considerarse como aceptable (en el caso de 1040 μ g/L el valor está prácticamente dentro del rango). Su valor se encuentra fuera del intervalo establecido por una diferencia bastante significativa. Es aquí donde se puede ver que el método empieza a presentar algunas limitaciones a este nivel de concentración.

Tabla 16: Precisiones (repetitividad) y recuperaciones esperadas en función del contenido de analito.²⁴

Concentración	RSD (%)	Recuperación (%)
8,16 mg/L	7,3-11	80-110
3,06 mg/L	7,3-11	80-110
1040 μ g/L	7,3-11	80-110
208 μ g/L	11-15	80-110
40,8 μ g/L	15-21	60-115
10,2 μ g/L	\approx 21	60-115

4.4. Determinación de riboflavina en las muestras

Una vez obtenidos los calibrados por medio de las dos técnicas y validados los correspondientes al HPLC, se cuantificó la vitamina B₂ en las muestras.

4.4.1. Espectrofluorimetría

En los sobrenadantes de los cultivos de las cepas E11, E51, L8 y L1 se pudo confirmar la ausencia de vitamina B₂. Los espectros proporcionados por el espectrofotómetro de fluorescencia utilizado carecían de picos y las intensidades a 525 nm eran o muy bajas o negativas. Por lo tanto, no se pudo cuantificar. Con las cepas SN6 y SN6 X ocurrió justo todo lo contrario (Tabla 17; Figura 24). Para las muestras, cuya matriz fue BD Difco esterilizado por filtración, se empleó los calibrados de PID y CDM. La señal correspondiente al medio PID fermentado por la cepa SN6 fue mayor que la señal conseguida por la concentración máxima del rango de calibración. Por ello, se procedió a diluir la muestra a la mitad con agua Milli-Q. La intensidad obtenida en esta situación fue de 437,03 unidades arbitrarias. Una vez realizada la interpolación, se aplicó el factor de dilución.

Para calcular las desviaciones estándar de las concentraciones de las muestras (s_{x_0}) se empleó la Ecuación 3. y_0 hace referencia a la muestra y x_i , \bar{x} e \bar{y} a las disoluciones estándar de los calibrados. \bar{x} e \bar{y} indican valores medios. Los otros dos son valores individuales. Las y corresponden al logaritmo en base diez de la intensidad fluorescente y las x , al logaritmo en base diez del contenido de riboflavina. El resto de términos ya se han especificado previamente.

$$s_{x_0} = \frac{s_r}{m} * \sqrt{1 + \frac{1}{N} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{m^2 * \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \text{ (Ecuación 3)}^{22}$$

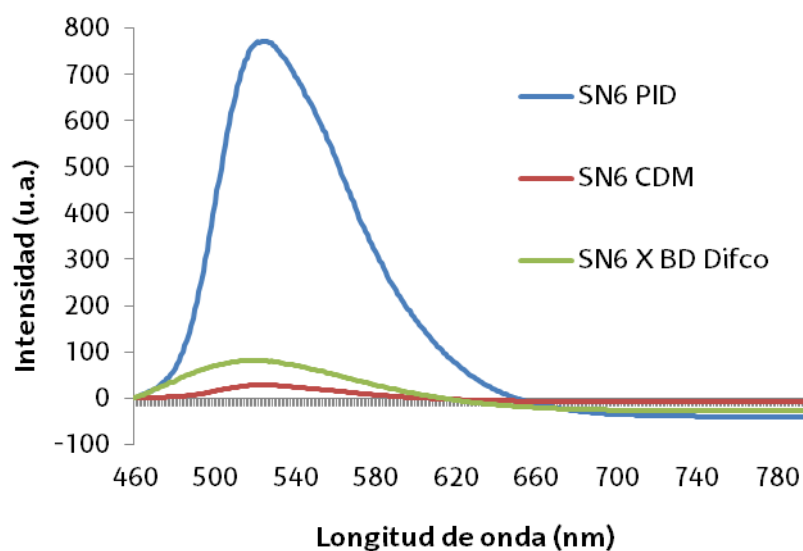


Figura 24: Espectros de emisión de los medios de cultivo PID y CDM fermentados por la cepa SN6 y BD Difco por la SN6 X. Todos ellos carentes de materia sedimentable.

Tabla 17: Resultados conseguidos para las muestras de SN6 y SN6 X por espectrofluorimetría.

Cepa	Medio de cultivo	Intensidad a 525 nm (u.a.)	Concentración (mg/L)
SN6	PID	771,41	$4,89 \pm 0,07$
	CDM	27,59	$0,11 \pm 0,03$
SN6 X	BD Difco sin caramelizar	79,81	$0,38 \pm 0,04$ (recta de PID)
			$0,37 \pm 0,03$ (recta de CDM)

4.4.2. HPLC

Los cromatogramas pertenecientes a las estirpes E11, E51, L1 y L8 no presentaron ningún pico a 8,0 minutos confirmando de nuevo la ausencia de riboflavina en los sobrenadantes. Para las cepas SN6 y SN6 X sí se obtuvieron picos (Figuras 25, 26, 27 y 28).

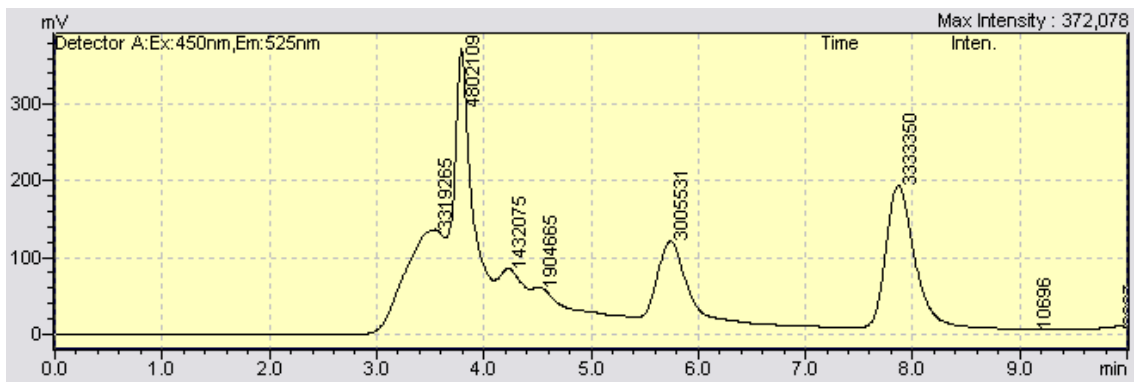


Figura 25: Cromatograma del medio BD (caramelizado) fermentado por la cepa SN6 sin materia sedimentable.

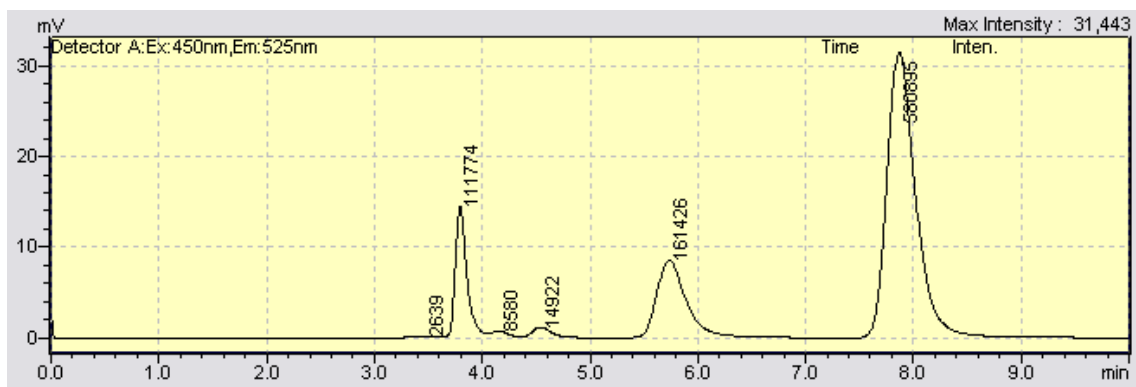


Figura 26: Cromatograma del medio PID fermentado por la cepa SN6 sin materia sedimentable.

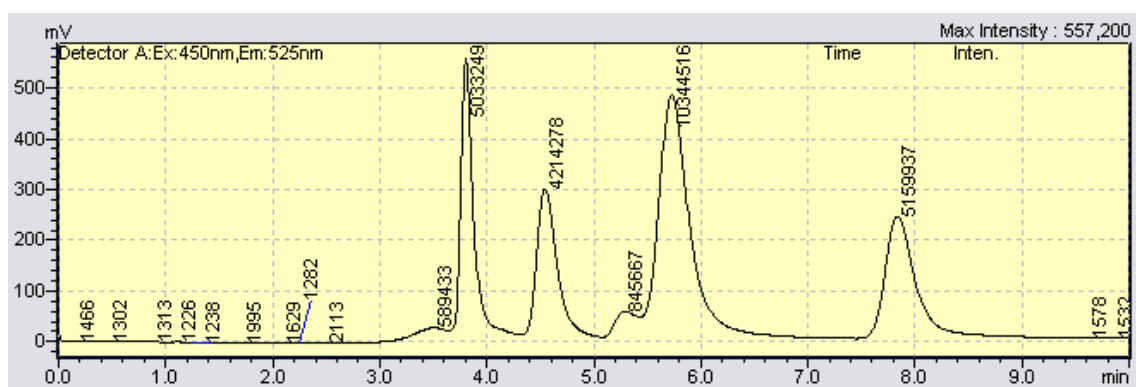


Figura 27: Cromatograma del medio CDM fermentado por la cepa SN6 sin materia sedimentable.

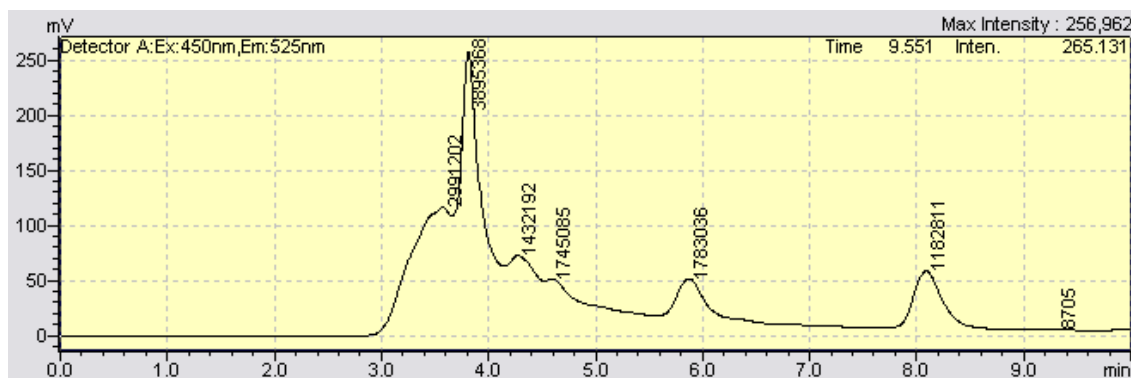


Figura 28: Cromatograma del medio BD (no caramelizado) fermentado por la cepa SN6 X sin materia sedimentable.

La Tabla 18 recoge los resultados conseguidos en la determinación cromatográfica para las cepas SN6 y SN6 X. Las respuestas del detector en el caso de BD Difco, es la resta de la señal de fondo del medio a la señal de la muestra. Para el cálculo de las desviaciones también se utilizó la Ecuación 3. En esta ocasión, para dicha ecuación, las y son la respuesta del detector y las x , la concentración de vitamina B₂.

Tabla 18: Resultados obtenidos para las muestras de SN6 y SN6 X por HPLC junto con la sensibilidad empleada para la cuantificación.

Cepa	Sensibilidad	Medio de cultivo	Respuesta del detector (mV)	Concentración (mg/L)
SN6	Media	BD caramelizado	183,760	0,58 ± 0,02
	Baja	PID	31,443	3,18 ± 0,14
	Alta	CDM	246,764	0,0238 ± 0,0005
SN6 X	Media	BD sin caramelizar	52,054	0,16 ± 0,02

En los cromatogramas indicados se puede observar que aparte del pico de la riboflavina a 8,0 minutos, aparecen otros picos de diversa intensidad a unos tiempos de retención inferiores. En el intento de identificación de dichos picos, se pensó en la posibilidad de que correspondieran a los vitámeros de dicha vitamina (FMN y FAD). Por ello, se inyectó una disolución que contenía los tres compuestos, a una sensibilidad media (Figura 29).

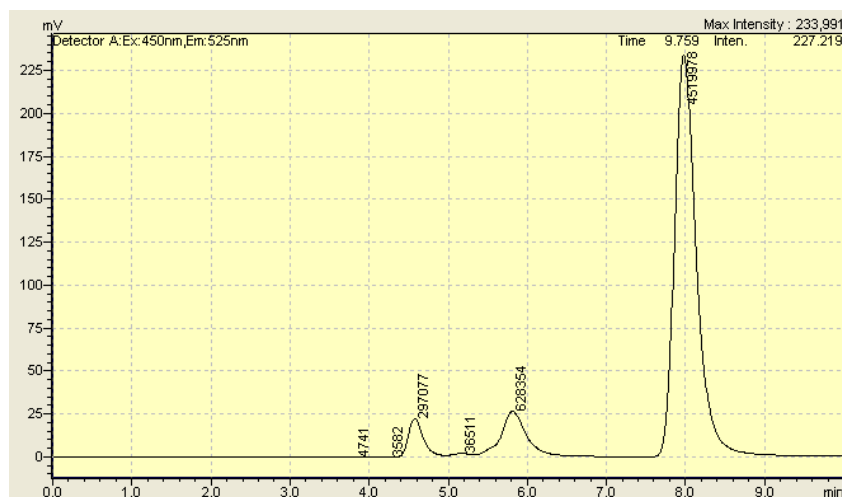


Figura 29: Cromatograma de la disolución que contenía riboflavina, FMN y FAD. El primer pico sería el FAD, el segundo el FMN y el último, el analito de interés de este trabajo. El orden de elución se confirmó con el proporcionado por la referencia número 13. Las condiciones cromatográficas (sobre todo las fases) de dicho artículo son similares a las empleadas en este trabajo.

Volviendo a las muestras (sobre todo PID y CDM), el pico que aparece a casi 6,0 minutos (teniendo en cuenta el cromatograma anterior) podría pertenecer al FMN y el pico que está entre 4,0 y 5,0 minutos, al FAD. No se pudo identificar el que está un poco por debajo de 4,0 minutos.

4.4.3. Comparación de las concentraciones obtenidas por ambos métodos

Para poder realizar la comparación de forma gráfica, se representaron las concentraciones obtenidas en las muestras por espectrofluorimetría frente a las conseguidas mediante HPLC (Tabla 19 y Figura 30).

Tabla 19: Comparación de los contenidos obtenidos por ambas técnicas.

Muestra	Contenido por espectrofluorimetría (mg/L)	Contenido por HPLC (mg/L)
SN6 PID	4,89 ± 0,07	3,18 ± 0,14
SN6 CDM	0,11 ± 0,03	0,0238 ± 0,0005
SN6 X BD sin caramelizar	0,38 ± 0,04	0,16 ± 0,03

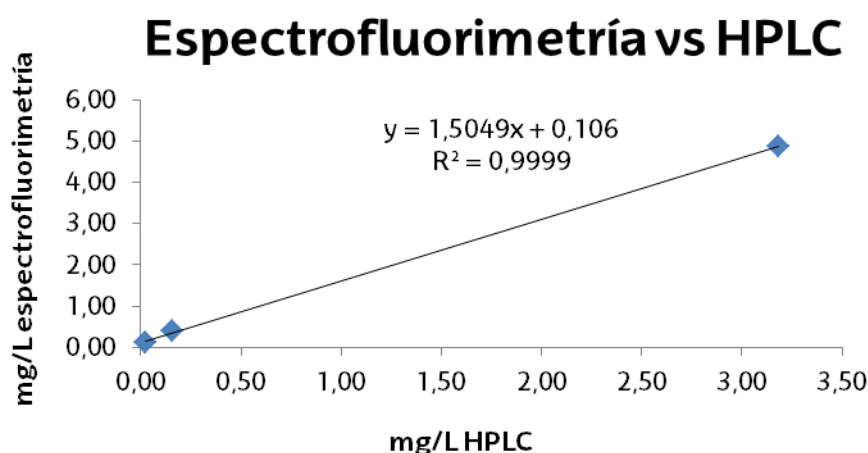


Figura 30: Gráfica comparativa de las concentraciones por ambas técnicas.

El hecho de que la pendiente de la recta obtenida sea mayor que uno (1,5), implica que las concentraciones obtenidas a través del espectrofluorímetro son mayores. Esto no significa que los resultados de una técnica estén mal, sino que el HPLC, es capaz de discriminar los vitámeros FAD y FMN. Los derivados de la riboflavina tienen la misma longitud de onda de máxima emisión (se obtuvieron sus espectros de emisión en agua y presentaban la misma forma que el del analito). Por lo tanto, la espectrofluorimetría determina la suma de las concentraciones de los tres compuestos, mientras que, el HPLC, sólo determina la vitamina B₂ como tal. Es decir, el método es selectivo. Casi todas las muestras que contienen riboflavina son analizables cuantitativamente por HPLC, excepto la de la cepa SN6 X, ya que la concentración se encuentra por debajo del LOQ (228 µg/L). En realidad, la riboflavina aquí sólo sería detectable.

Si se quisiera cuantificar por HPLC el FMN y el FAD en las muestras empleadas, en primer lugar, se tendrían que evaluar sus coeficientes de absorción y sus capacidades de emisión, registrando los espectros de absorción y emisión para cada uno de ellos (incluido el compuesto parental). Las disoluciones empleadas tendrían que tener las mismas concentraciones, lo mismo con la sensibilidad seleccionada.

Una vez hecho esto, podrían darse dos fenómenos. El primero, que la capacidad de emisión de los tres sea la misma. En esta situación, se podría utilizar el método de HPLC diseñado en este trabajo. El segundo, que presenten diferentes. En este último caso, habría que crear rectas de calibrado independientes para cada compuesto.

5. CONCLUSIONES

Durante el transcurso del trabajo que se llevó a cabo y teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se han podido sacar diferentes conclusiones. En primer lugar, cabe mencionar que se pudieron cumplir todos los objetivos establecidos desde un principio. En cuanto al cribado, el mejor medio para el crecimiento y desarrollo de las bacterias de ácido láctico empleadas resultó ser el denominado PID. Además, sin la vitamina B₂, las cepas que mejor crecieron en los medios de cultivo utilizados fueron la SN6 (superproductora) y la L1. Por mediación de ambas técnicas (espectrofluorimetría y HPLC), se pudo demostrar la incapacidad de las cepas E11, E51, L1 y L8 para excretar riboflavina. Este factor implica su no aplicabilidad en la fortificación de alimentos fermentados. A lo que a la comparación se refiere, se pudo ver que el método cromatográfico diseñado era selectivo con respecto al analito de interés, ya que permite eliminar las interferencias provocadas por sus dos vitámeros, FMN y FAD. Finalmente, en la validación, se pudieron evaluar (aparte de la selectividad) otros parámetros de calidad. Se demostró su linealidad y sensibilidad. Además, se determinó su repetitividad y exactitud, obteniendo valores razonables y aceptables con respecto a los órdenes de magnitud de las concentraciones.

5. CONCLUSIONS

Throughout the course of this research project and taking into account the results, many different conclusions have been drawn. First of all, it should be noted that all the set goals were reached. Regarding the screening, PID proved to be the best broth for the development and growth of the employed lactic acid bacteria. In addition, in the absence of B₂ vitamin, SN6 and L1 were the strains which grew best when being inoculated into the culture media. By means of spectrofluorimetry and HPLC techniques, it was shown that E11, E51, L1 and L8 strains were not capable of excreting riboflavin. This fact implies that they cannot be used in order to fortify fermented food. As far as the comparison is concerned, it could be seen that the chromatographic method was selective with respect to the analyte, because it allows the chemist to remove the interferences produced by FMN and FAD. Finally, in relation to the validation process, other kind of figures of merit could be assessed apart from selectivity. The method was linear and sensitive. Furthermore, repeatability and accuracy were calculated, yielding reasonable and acceptable results according to the concentration levels.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. García-Angulo, V.A. (2017). Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(2), 196-209.

2. Osório, M.V., Marques, S.S., Oliveira, H.M., Barreiros, L. & Segundo, M.A. (2016). Fluorometric method based on molecular recognition solid-phase extraction for determination of riboflavin in milk and infant formula. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 141-146.

3. Acevedo-Rocha, C.G., Gronenberg, L.S., Mack, M., Commichau, F.M. & Genee, H.J. (2018). Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 18-29.

4. Sheraz, M.A., Kazi, S.H., Ahmed, S., Anwar, Z. & Ahmad, I. (2014). Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 10, 1999-2012.

5. Royal Society of Chemistry (RSC). (2019). *Chemspider: Search and share chemistry* [Basede datos].

Recuperado de: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=559060>.

6. Royal Society of Chemistry (RSC). (2019). *Chemspider: Search and share chemistry* [Base de datos].

Recuperado de: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=559059>.

7. Thakur, K., Tomar, S.K. & De, S. (2016). Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microbial Biotechnology*, 9(4), 441-451.

8. Royal Society of Chemistry (RSC). (2019). *Chemspider: Search and share chemistry* [Base de datos].

Recuperado de: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=25060405>.

9. Thakur, K. & Tomar, S.K. (2016). *Invitro study of riboflavin producing lactobacilli as potential probiotic. LWT-Food Science and Technology*, 68, 570-578.

10. Yépez, A., Russo, P., Spano, G., Khomenko, I., Biasioli, F., Capozzi, V. & Aznar, R. (2019). *In situ* riboflavin fortification of different kefir-like cereal-based beverages using selected Andean LAB strains. *Food Microbiology*, 77, 61-68.
11. Thakur, K., Tomar, S.K., Brahma, B. & De, S. (2016). Screening of Riboflavin-Producing Lactobacilli by a Polymerase-Chain-Reaction-Based Approach and Microbiological Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 1950-1956.
12. Harris, D.C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis*. New York: W.H. Freeman and Company, pp. 556-557, 571-572, 583-584.
13. Fracassetti, D., Limbo, S., D'Incecco, P., Tirelli, A. & Pellegrino, L. (2018). Development of a HPLC method for the simultaneous analysis of riboflavin and other flavin compounds in liquid milk and milk products. *European Food Research and Technology*, 244, 1545-1554.
14. Schmidt, A., Schreiner, M.G. & Mayer, H.K. (2017). Rapid determination of the various native forms of vitamin B₆ and B₂ in cow's milk using ultra-high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1500, 89-95.
15. Kowalczyk, A., Sadowska, M., Krasnodebska-Ostrega, B. & Nowicka, A.M. (2017). Selective and sensitive electrochemical device for direct VB₂ determination in real products. *Talanta*, 163, 72-77.
16. Terrade, N., Noël, R., Couillaud, R. & de Orduña, R.M. (2009). A new chemically defined medium for wine lactic acid bacteria. *Food Research International*, 42, 363-367.
17. Zimbro, M.J., Power, D.A., Miller, S.M., Wilson, G.E. & Johnson, J.A. (Ed.). (2009). *Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media*. Sparks: BD Diagnostics-Diagnostic Systems, pp. 473-474.
18. Teusink, B., van Enckevort, F.H.J., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E.J. & Siezen, R.J. (2005). In Silico Reconstruction of the Metabolic Pathways of *Lactobacillus plantarum*: Comparing Predictions of Nutrient Requirements with Those from Growth Experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7253-7262.
19. Lund, M.N. & Ray, C.A. (2017). Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 4537-4552.

20. Konieczka, P. & Namienik, J. (2009). *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory: A Practical Approach*. Boca Raton: CRC Press, pp. 143-150.
21. Harris, D.C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis*. New York: W.H. Freeman and Company, pp. 80, 84-87.
22. Miller, J.N. & Miller, J.C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Madrid: Pearson Educación, S.A.; pp. 123-124, 263.
23. Esbensen, K.H. & Swarbrick, B. (2018). *Multivariate Data Analysis: An introduction to Multivariate Analysis, Process Analytical Technology and Quality by Design*. Oslo: CAMO Software AS, pp. 171-178.
24. AOAC International (Association of Official Analytical Chemists). (2016). *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*.

Recuperado de: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.