

# BOLETIN del INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS

DEPARTAMENTO DE GANADERIA  
DIRECCION GENERAL DE AGRICULTURA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
CASILLA 4527 — CORREO 2 — SANTIAGO, CHILE

Vol. I

NOVIEMBRE DE 1952

Fascículo 9

## VALORACION MICROBIOLÓGICA DE RIBOFLAVINA EN ALFALFA Y HENO DE ALFALFA (\*)

Irma Pennacchiotti M. y Marta Vargas U.  
Químicos Farmacéuticos, Sección  
Química y Forrajes

Carlos Flores del F. \*\*  
Médico Veterinario, Sección Micología  
y Zimología.

Rosa Urbá M.  
Químico Farmacéutico.

De los diferentes métodos que se emplean para la valoración de la riboflavina en productos alimenticios, se distinguen tres por sus resultados más homogéneos y satisfactorios: el fluorimétrico, el microbiológico y el animal (1). Todos ellos son de resultados similares cuando se trabaja con muestras de alta potencia.

El método microbiológico es, a nuestro juicio, el que ofrece mayores ventajas en lo que dice relación con el estudio cuantitativo de la vitamina B<sup>2</sup> en los forrajes y en particular de la alfalfa común (*Medicago sativa*) por su rapidez, especificidad y exactitud. A todo esto, debemos agregar la ventaja de poder trabajar en un reducido espacio del laboratorio, sin necesidad de aparataje costoso; siendo factible, de este modo, el trabajo en serie.

La base del método, como se sabe, consiste en el aprovechamiento de la particularidad que presenta el *Lactobacillus casei* de requerir como elemento esencial para su crecimiento de la presencia de riboflavina en el medio de cultivo. El grado de desarrollo de la cepa y la consiguiente fer-

- 
- \* Tesis de prueba de la Srta. Rosa Urbá M., para optar al título de Químico Farmacéutico de la Universidad de Chile.
  - \*\* Los autores agradecen al Dr. Hermann Schmidt-Hebbel, Profesor de Bromatología y Toxicología de la Facultad de Química y Farmacia, por la colaboración prestada en la realización de este trabajo; como asimismo a las personas que han contribuido directa o indirectamente en él.

mentación láctica es, dentro de cierto rango, función de la concentración de la riboflavina en el medio; de modo que la titulación mediante soluciones alcalinas o potenciométricamente, como se ha hecho en este trabajo, es suficiente para establecer la curva standard como base para los cálculos de contenido vitamínico en las muestras problemas.

## MATERIAL Y METODO

**A.—MATERIAL.**— Se valoró el contenido de riboflavina en 29 muestras de alfalfa verde y en 28 muestras de heno de alfalfa, obtenidas según el método del "azar". Este método consiste en dividir los potreros de la zona en cuadrados o rectángulos, los que se enumeran y sortean. En cada sector sorteado se toman muestras cada 10, 20, 30, 40 metros, según la extensión del terreno.

En el caso del heno, las muestras existentes en el laboratorio se enumeraron y luego se sortearon.

Tanto las muestras de alfalfa verde como las de heno de alfalfa, provienen en su mayoría de la zona central del país.

**Cepa empleada.**— El microorganismo empleado fué el *Lactobacillus casei* 9595 procedente de la "American Type Culture Collection" (EE. UU.).

Antes de empezar los estudios fué necesario comprobar la pureza de las cepas, mediante el examen microscópico y de sus propiedades culturales y fermentativas: correspondiendo sus características a las citadas por Bergey (2).

Para la conservación de la cepa se usó el "Agar Jugo de Tomates" Difco (3), efectuándose los trasplantes cada 15 días.

**B.—METODICA.**—1.— **Preparación del medio basal.**— Para la preparación del medio basal y soluciones stock y standard de Riboflavina, se siguieron las indicaciones del A. O. A. C. (4).

2.—**Preparación del medio para inoculum.**— A dos tubos con 5 cc de medio basal se agregan 5 cc de una solución que contenga 1 gama de riboflavina/cc (1 cc de la solución stock de riboflavina se lleva a 25 cc con agua destilada). Se tapan los tubos con algodón y se esterilizan al autoclave a 110° C. por 30'. Debe evitarse la exposición de los tubos a la luz después que la riboflavina ha sido agregada.

En los tubos ya fríos se siembra *Lactobacillus casei*, a partir del cultivo stock, y se lleva a la estufa a 37° C., por espacio de 24 horas.

3.—**Preparación del Inoculum.**— Una vez obtenido el desarrollo del *Lactobacillus casei* en el medio especial para inoculum, se vierte asépticamente a un tubo de centrifuga estéril, se tapa y se centrifuga a 5.000 r. p. m. durante 10'. Se vacía el líquido sobrenadante y se agregan 10 cc de suero fisiológico estéril; se homogeniza y se vuelve a centrifugar, vaciando el líquido sobrenadante. El residuo se suspende en 10 cc. de suero fisiológico; de esta suspensión se toma 1 cc y se vacía a un matraz con 20 cc de suero fisiológico estéril.

Esta solución constituye el Inoculum.

4.—Preparación de la serie standard de riboflavina.— Se preparan 3 series de tubos en la forma siguiente:

Tubo N°	Medio basal	Sol. Stand. riboflavina	Agua dest.	Gamas de riboflavina
1	5 cc	0.0 cc	5.0 cc	0.00
2	5 cc	0.5 cc	4.5 cc	0.05
3	5 cc	1.0 cc	4.0 cc	0.10
4	5 cc	1.5 cc	3.5 cc	0.15
5	5 cc	2.0 cc	3.0 cc	0.20
6	5 cc	2.5 cc	2.5 cc	0.25
7	5 cc	3.0 cc	2.0 cc	0.30
8	5 cc	5.0 cc	0.0 cc	0.50

El volumen final de cada tubo será de 10 cc. Se esterilizan al autoclave a 110° C. durante 30'. \* Una vez fríos, cada tubo se siembra con una gota de Inoculum.

Cada curva standard sirve para una serie de muestras preparadas simultáneamente y con el mismo medio basal.

5.—Preparación de las muestras.— Obtención del hidrolizado de alfalfa.— Se pesan 3 g. de alfalfa picada y se agregan 150 cc de ácido clorhídrico 0.1N. Se mezcla y se lleva al autoclave a 120° C. por espacio de 20'. Se decanta el líquido sobrenadante y se añaden 150 cc de ácido clorhídrico N. Se hidroliza al autoclave durante 20' a 120° C.; se decanta y lava el residuo varias veces. Los líquidos se reúnen y se ajusta el pH entre 6.6 y 6.8 con solución concentrada de hidróxido de sodio. Se lleva a volumen a 500 cc y se filtra.

Cada cc de esta solución equivale a 0.006 g de alfalfa.

Con este hidrolizado se prepara la escala que a continuación se indica.

Tubo N°	Medio basal	Hidrolizado	Agua dest.	mg. de alfalfa
1	5 cc	0.5 cc	4.5 cc	3
2	5 cc	1.0 cc	4.0 cc	6
3	5 cc	1.5 cc	3.5 cc	9
4	5 cc	2.0 cc	3.0 cc	12
5	5 cc	3.0 cc	2.0 cc	18
6	5 cc	4.0 cc	1.0 cc	24

El volumen final de cada tubo será de 10 cc. Se esterilizan a 110° C., durante 30'.

6.—Siembra e incubación.— Para la siembra se usa el Inoculum recién preparado, colocando una gota de la suspensión microbiana en cada tubo de ensayo.

(\*) La esterilización de los medios se efectuó a 110° C. durante 30', en vez de 120° C. durante 20', como lo indican todos los métodos, con el fin de evitar la caramelización de la dextrosa.

Se incuba a 37° C. durante 72 horas; la temperatura no debe variar en más de medio grado. Transcurrido este tiempo, se lleva al refrigerador con el objeto de detener un crecimiento ulterior. La acidez producida por el desarrollo del *Lactobacillus casei*, se mide potenciométricamente.

7.—Cálculo.— Para el cálculo se usó el método del "slope-ratio" (5), método que presenta la ventaja sobre el de la "curva simple", de ser más preciso.

Con el fin de facilitar la comprensión del cálculo, se tomará como ejemplo los valores de la muestra N.º 3:

**Valores de la curva standard de riboflavina:**

Gamas de riboflavina:	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.50
pH	5.69	5.20	5.10	5.01	4.90	4.85	4.80	4.70

**Valores de la curva de la muestra analizada:**

mg. de alfalfa	3	6	9	12	18	24
pH	5.49	5.41	5.30	5.20	5.15	5.05

El descenso en la curva standard es igual a la diferencia de pH entre el blanco y el valor de la concentración más alta. En el ejemplo sería:

$$\begin{array}{r} 5.69 \\ -4.70 \\ \hline \end{array}$$

0.99 para 0.5 gamas, luego 1.98 para 1 gama.

En la sustancia analizada esta diferencia está dada por el aumento de pH entre 3 y 24 mg.:

$$\begin{array}{r} 5.49 \\ -5.05 \\ \hline \end{array}$$

0.44 Esta diferencia de pH corresponde a 21 mg.; para 1.000 mg. sería 20.9.

La cantidad de riboflavina de la muestra resulta de dividir la diferencia obtenida en la curva problema por la de la curva standard:

$$\begin{aligned} 20.9 : 1.98 &= 10.5 \text{ gamas de riboflavina/gramo;} \\ &= 10.5 \text{ mg. de riboflavina/1000 gramos;} \\ &= 1.05 \text{ mg. de riboflavina/100 gramos de muestra.} \end{aligned}$$

Cuadro N.º 1.— PROMEDIOS ARITMETICOS, RANGOS Y DESVIACIONES STANDARDS DE LAS MUESTRAS DE ALFALFA Y HENO DE ALFALFA

Datos	Alfalfa verde		Heno de Alfalfa	
	29 Humedad g/100 g	Riboflavina s. fresca mg/100 g	28 Humedad g/100 g	Riboflavina s. fresca mg/100 g
Promedio aritmético	76.90	0.93	13.36	1.46
Rango	83.60—68.30	1.32—0.69	14.0—12.4	1.64—1.10
Desv. Standard	±4.31	±0.15	±0.54	±0.14

Para el cálculo de la desviación standard se empleó la fórmula:

$$\sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$$

tomando en consideración el número de muestras analizadas.

Cuadro N.º 2.—COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS DE RIBOFLAVINA DADOS POR MORRISON (6) Y LOS OBTENIDOS EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS, EX-PRESADOS SOBRE SUSTANCIA FRESCA

	Alfalfa verde mg/100 g	Heno de alfalfa mg/100 g
Morrison	0.45	1.34
I. I. V.	0.93 ± 0.15	1.46 ± 0.14

### RESUMEN Y CONCLUSIONES

- Se hizo la valoración de riboflavina usando el método microbiológico en 29 muestras de alfalfa verde y 28 de henos de alfalfa.
- Los resultados obtenidos son los siguientes:
  - Alfalfa verde: 0.93 ± 0.15 mg/100 g s. fresca.
  - Heno de alfalfa: 1.46 ± 0.14 mg/100 g s. fresca.
- Para la medición de la acidez láctica final, se empleó el método potenciométrico en lugar del titrimétrico, por la ventaja que tiene el primero de ser más exacto y rápido en la lectura de los resultados.
- Del estudio comparativo entre los valores de riboflavina dados por Morrison (6) y los obtenidos por el Instituto de Investigaciones Veterinarias se deduce: que tanto la alfalfa verde como el heno de alfalfa nacionales presentan un mayor contenido en dicha vitamina.

## S U M M A R Y

The content of riboflavin in 29 samples of alfalfa and 28 samples of alfalfa hay was tested by means of a microbiological method. The microorganism used was *Lactobacillus casei* from the American Type Culture Collection (U.S.A.).

The figures obtained were:

Alfalfa 0.93 mg/100 g.

Alfalfa hay 1.46 mg/100 g.

The sterilization of the media was accomplished at 110° C. for 30 minutes instead of at 120° C. for 20 minutes as the original method indicated.

The measurement of acidity was accomplished with a pH meter instead of titrating with NaOH.

The values obtained have been compared with those given by Morrison and are indicated in Table 2.

## R E S U M É

Dans ce travail la Riboflavine fut dosée par la méthode microbiologique en 29 échantillons de luzerne et 28 échantillons de foin de luzerne. Le microorganisme usé fut le *Lactobacillus casei* 9595 provenant de l'American Type Culture Collection U. S. A.

Les valeurs obtenues sont:

Luzerne 0.93 mg%

Foin de luzerne 1.4 mg%

L'esterization du milieu fut fait à 110° C. pendant 30 minutes au lieu de 120° C pendant 20 minutes comme la méthode originale indiquée.

Le dosage de l'acidité fut fait par la mesure du pH au lieu de la titulation avec NaOH.

Les valeurs obtenues ont été comparées avec les données par Morrison et elles se trouvent dans la Tableau N.º 2.

## R I A S S U N T O

A 29 campioni dell'Erba medica e 28 del fieno venne dosata la Riboflavina per mezzo del metodo microbiologico, adoperando il microrganismo *Lactobacillus casei*, proveniente dell'American Type Culture Collection.

In quanto ai valori ottenuti sono:

Erba medica 0.93 mg/100 g

Fieno 1.46 "

La sterilizzazione del terreno venne fatta a 110° C per 30' invece di 120° C per 20', come s'indica nel metodo originale.

H. dosaggio dell'acidità finale si è misurata col potenziometro invece di titolare con l'idrossido di sodio.

Si danno i valori ottenuti in confronto a quelli di Morrison nella Tabella N.º 2.

## ZUSAMMENFASSUNG

Riboflavin wurde quantitativ mittels der mikrobiologischen Methode festgestellt und zwar an 29 Mustern von Luzerne und 28 Mustern von Luzernenheu (*M. Sativa*). Die Mikroorganismen waren *Lactobacillus casei* aus der American Type Culture Collection (USA).

Die erhaltenen Werte waren:

Luzerne . . . . .	0.93 mg %
Luzernenheu . . . . .	1.40 mg %

Die Sterilisation des Mediums wurde bei 110° während 30 min gemacht; anstatt bei 120° während 20 min, wie die ursprüngliche Methode angab.

Man benutzte den pH-Messer statt der Titration mit NaOH, um den Säuregehalt festzustellen.

Die erhaltenen Werte wurden mit denen von Morrison verglichen und sind auf Tabelle 2 verzeichnet.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—**METHODS OF VITAMIN ASSAY**. 158 Intersc. Publ. Ed. II.— New York, 1951.
- 2.—**BERGEY'S**. Manual of determinative Bacteriology: 349 - 350. Ed. 11— New York 1951.
- 3.—**DIFCO**. Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents: 58. Ed. Difco Laboratories VII Ed. Detroit Michigan, 1943.
- 4.—**ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS**. Methods of Analysis: 778-780. Ed. Board. VII Ed. Washington, 1950.
- 5.—**BARTON WRIGHT E. C.** Practical Methods of the Microbiological Assay of Vitamin B Complex and Essential Amino Acids: 18-20. Ed. Ashe Laboratories London, 1945.
- 6.—**MORRISON F. B.** Alimentos y Alimentación del Ganado. 1:165-166. Ed. U.T.H.A. XXI. Ed. México, 1951.