

ESTUDIO DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA SÍNTESIS DE LICOPENO A PARTIR DE *Clavibacter michiganensis sub. michiganensis*

CULTURE MEDIA FOR LYCOPENE SYNTHESIS FROM *Clavibacter michiganensis sub. michiganensis*

Ana M. TORRES L.¹, Luisa F. ROJAS H.¹, Juan C. MAZO R.¹, Catalina SAMPEDRO.¹,
Stella RESTREPO G.¹, Lucia ATEHORTÚA G.¹, Carlos D. ÁLVAREZ M.¹ y Rigoberto RÍOS E.^{1*}

RESUMEN

El licopeno es un carotenoide de elevado poder antioxidante que se obtiene a partir de fuentes naturales especialmente frutas y vegetales; también puede ser producido mediante el cultivo de microorganismos. En el presente artículo se estudia la síntesis de licopeno a partir del cultivo sumergido de *Clavibacter michiganensis sub. michiganensis*. Se considera el diseño de medios de cultivo y la separación, cuantificación y caracterización del carotenoide. Con el fin de establecer los niveles más apropiados para los factores de estudio (fuente de carbono, fuente de nitrógeno y sales), se programa un diseño de factor único; para el estudio de optimización se emplea un diseño central compuesto (3^3), cuya variable respuesta es la concentración de producto. El ajuste estadístico de los resultados experimentales muestra valores de fuente de carbono (glucosa: 7.5 g/L), nitrógeno (peptona: 10g/L y extracto de levadura: 10 g/L) y sales (cloruro de sodio: 10 g/L y fosfato dipotásico: 1 g/L), como constituyentes del medio de cultivo para lograr la mayor concentración de pigmento (2.85 mg carotenos/mL).

El producto obtenido se caracteriza como licopeno a partir de técnicas de Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear de Protones.

Palabras Clave: *Clavibacter michiganensis*, licopeno, medios de cultivo, antioxidante

ABSTRACT

Lycopene is a carotenoid with high antioxidant characteristics that is being obtained from natural sources such as fruits and vegetables; and can also be produced by microorganisms. In this research, we study the synthesis of lycopene by the submerged culture of *Clavibacter michiganensis sub. michiganensis*; among others, it is considered the design of culture media for the carotenoid production and its separation, quantification and characterization. With the purpose of establishing the most appropriate levels for factors such as carbon and nitrogen sources, and salts, a unique factor experimental design is programmed; an optimization study is made from the results of a central (3^3) combined experimental design. The statistical adjustment of the experimental results gives values of carbon source (glucose: 7.5 g/L), nitrogen (peptone: 10g/L and yeast extract: 10 g/L) and salts (sodium chloride: 10 g/L and di-potassium phosphate: 1 g/L), as constituent of the culture media to achieve the largest concentration of lycopene (approximately 2.85 mg carotenoid/mL). The carotenoid produced by submerged culture is characterized as lycopene by using Infrared and Proton Nuclear Magnetic Resonance techniques.

Keywords: *Clavibacter michiganensis*, lycopene, culture media, antioxidant

¹ Grupo de Biotecnología Universidad de Antioquia A.A. 1226 Medellín – Colombia

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: rrios@udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

El licopeno ($C_{40}H_{56}$) se obtiene fundamentalmente a partir de fuentes naturales, especialmente frutas y vegetales. Recientes estudios han relacionado de forma directa el licopeno con la prevención de cierto tipo de cáncer en el hombre, especialmente el cáncer de próstata^{1,2}, así como con una menor incidencia de afecciones coronarias como la arteriosclerosis³. No se han determinado plenamente las bases biológicas ni fisicoquímicas de estas propiedades, pero parecen directamente relacionadas con el elevado poder antioxidante del licopeno, el cual actúa como neutralizador de radicales libres (óxido y peróxido) atenuando los daños oxidativos sobre los tejidos; el poder antioxidante de Licopeno es muy superior al de otros carotenos y antioxidantes naturales⁴. Estos hallazgos justifican el gran interés comercial despertado por el Licopeno, en los últimos tiempos.

Licopeno también puede ser obtenido a partir del cultivo de microorganismos (hongos y bacterias). La bacteria *Clavibacter michiganensis* sb. *michiganensis* produce un pigmento amarillo, constituido principalmente por un tipo de caroteno, el licopeno. La síntesis de licopeno se ve afectada por la velocidad de crecimiento del microorganismo, la edad del cultivo y las condiciones fisicoquímicas y del medio de cultivo⁵. Existe un número limitado de reportes bibliográficos sobre medios de cultivo y requerimientos nutricionales para esta subespecie; de todos ellos se destaca el trabajo de Grimont & Grimont⁶.

El licopeno presenta las siguientes propiedades físicas: punto de fusión: 170°C, soluble en cloroformo frío y caliente y en benceno caliente; ligeramente soluble en benceno frío y poco soluble en etanol frío y caliente, y en metanol. En la literatura se citan algunos solventes usados para la extracción de licopeno, al igual que algunas de sus propiedades espectrales, absorción máxima (nm) en disulfuro de carbono a longitudes de onda de 548, 507.5, 477; en cloroformo: 517, 480, 453; en etanol: 503, 472, 443, entre otros⁷. Los sistemas de extracción de licopeno son costosos, lo que aunado a sus características de baja estabilidad limita su aplicación en otros sectores como el de colorantes naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

La bacteria *Clavibacter michiganensis* sb. *michiganensis*, fue donada por la "Colección Española de cultivos tipo", Universidad de Valencia, España; la cepa fue mantenida en cajas de petri conteniendo medio NBY (en g/L: caldo nutritivo: 8, extracto de levadura: 2, fosfato ácido de potasio: 2, fosfato diácido de potasio: 0.5, agar: 15, solución de 50mL al 10% de glucosa y 1 mL de sulfato de magnesio heptahidratado: 5)

Medios de Cultivo

Para el estudio de medios de cultivo se evaluaron un total de 69 medios diferentes, incluyendo medios comerciales y formulados, a partir de un arreglo experimental del tipo central compuesto rotacional. Como fuentes de carbono se estudiaron: glucosa, sacarosa, carbonato de calcio, licor de maíz fermentado, gelatina, en diferentes niveles según el arreglo experimental. Como fuentes de nitrógeno se estudiaron: digerido triptico de caseína-peptona, extracto de levadura, peptona, a diferentes niveles. Como oligoelementos: fosfato dipotásico, cloruro de sodio, a diferentes niveles. Los medios de cultivo comerciales estudiados fueron: NBY, agar chocolate (en g/L: extracto de carne: 3, peptona: 5, glucosa: 10, cloruro de sodio: 5, agar: 15); agar sangre (en g/L: extracto de carne: 3, peptona: 5, cloruro de sodio: 8, agar: 15); Trypticase (medio líquido en g/L: digerido caseína pancreática 17, digerido papaínico de soya: 3, dextrosa: 2.5, cloruro de sodio: 5, fosfato dipotásico: 2.5)

Cinética de Cultivo.

Se estudiaron cinéticas de cultivo de 3, 5 y 7 días; edad del Inóculo: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13,14 horas; concentración del Inóculo: 1, 2, 4, 6, 8 y 10% del volumen de medio; agitación: 120 y 150 rpm. Conforme a las condiciones reportadas en la literatura como adecuadas para el cultivo de esta bacteria, se estableció la temperatura en 28°C, pH inicial del medio de cultivo ajustado a 7.3. El medio de cultivo usado fue (g/L): digerido triptico de caseína peptona 10, extracto de levadura 5, glucosa 5 y NaCl 5.

Técnicas Analíticas

Cuantificación de biomasa

La cuantificación de biomasa se hizo por Espectrofotometría, Espectrofotómetro TermoSpectronic Helios –Alfa.

Extracción y Cuantificación

Como solventes de extracción se estudiaron, solventes polares (metanol, acetona), solventes no polares (éter, benceno y hexano). Al término del proceso fermentativo, se tomaron muestras de 1mL de cultivo y se llevaron a tubos eppendorf; posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 minutos, con el fin de separar las células del medio de cultivo.

Una vez centrifugados, se retiró y desechó el sobrenadante, y las células se conservaron para extracción; la extracción se hizo adicionando 1 ml de solvente y centrifugando nuevamente durante 15 minutos a 5000 rpm. Este proceso se repitió hasta lograr retirar la mayor cantidad de pigmento posible. La solución solvente-pigmento se recolectó y se tomó una muestra para realizar la lectura de absorbancia a 450 nm. Cada ensayo de extracción se hizo con una (1) réplica. La cuantificación se hizo para carotenos totales; así, la concentración de carotenos se calculó teniendo en cuenta que 0.25 unidades de absorbancia corresponden a 1 mg de carotenos/mL⁸

Algunas variantes a este proceso se describen a continuación.

Lisis en presencia de NaOH 1N y éter como solvente: Este ensayo consideró una etapa adicional antes de la extracción; después de centrifugar, a la biomasa resultante se le adicionaron 5 mL de solución de NaOH con el fin de permeabilizar la membrana celular. La mezcla, solución de NaOH y pigmento, se llevó a ebullición lentamente hasta lograr sequedad incompleta. A continuación se adicionaron 5mL de solvente (éter) y se continuó con el procedimiento previamente descrito.

Lisis en presencia de Metanol y benceno como solvente: Una vez que las células fueron centrifugadas, se desechó el sobrenadante; la pared celular fue permeabilizada previa adición de 1 mL de metanol. Nuevamente se centrifugó por 15 min. a 5000 rpm, se recolectó la solución metanol-pigmento y este procedimiento se repitió hasta lo-

grar biomasa no pigmentada. A la solución resultante, se le adicionaron 5mL de benceno y 4mL de agua, se agitó por 10 minutos, la mezcla se transfirió a un embudo de separación y se dejó en reposo, buscando obtener fases, una acuosa (polar) y una orgánica (no polar); es de esperar que el caroteno esté solubilizado en la fase no polar, por lo tanto se decantó la fase acuosa del embudo y se lavó con benceno para extraer los posibles carotenos arrastrados. Se retiró la epifase (soluciones finales de benceno) posteriormente se diluyeron en benceno y se realizó la lectura de absorbancia a 450 nm. La concentración de carotenos se estimó sabiendo que 0.25 unidades de absorbancia corresponden a 1 mg de caroteno/mL⁸.

Lisis en presencia de metanol y hexano como solvente: El procedimiento empleado es similar al realizado en el ensayo anterior, solo que en lugar de benceno se utilizó hexano.

Estudio de Caracterización

Para el análisis de caracterización se emplearon técnicas de Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR Spectrometer MATTSON 5000) y Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN BRUCKER AMX 300)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de medios de cultivo

Para la activación de *Clavibacter michiganensis sb. michiganensis*, se empleó la metodología de recuperación de cultivo liofilizados, recomendada por la Colección Española de cultivos tipo, Universidad de Valencia - España. La bacteria fue sembrada en los medios NBY, agar chocolate, agar sangre y Tripticasa. De éstos, el medio NBY presentó los resultados más favorables en cuanto a crecimiento y pigmentación, siendo seleccionado para el mantenimiento de la cepa.

Para la producción del pigmento se evaluaron diferentes medios de cultivo, algunos de ellos reportados en la literatura como adecuados para el crecimiento y la síntesis del pigmento producido por *Clavibacter michiganensis sb. michiganensis*. Los demás medios fueron formulados, haciendo variaciones a los citados en la bibliografía o incluyendo otros nutrientes económicos comúnmente usados en el cultivo de bacterias.

A continuación se presenta la composición de los medios evaluados (en g/L), ver tabla 1; todos los ensayos se hicieron con una (1) réplica, la di-

ferencia entre sus valores nunca fue mayor al 10%. Los nombres de los diferentes medios se asignan de acuerdo a la referencia bibliográfica o a su composición.

Tabla 1. Medios de cultivo evaluados y su composición.

MEDIO DE CULTIVO	FUENTE DE C (g/L)	FUENTE DE N (g/L)	OLIGOELEMENTOS (g/L)
53	glucosa: 10	digerido triptico caseína-peptona: 10 extracto de levadura: 5	cloruro de sodio: 5
53-a	glucosa: 10	digerido triptico caseína-peptona: 10 licor de Maíz: 5	cloruro de sodio: 5
53-b	glucosa: 10	extracto de levadura: 5 licor de Maíz: 5	cloruro de sodio: 5
53-c	licor de maíz: 5	digerido triptico caseína-peptona: 10 extracto de levadura: 5	cloruro de sodio: 5
583*	sacarosa: 10 carbonato de calcio: 20	extracto de levadura: 5	---
583-a	sacarosa: 10 carbonato de calcio: 6.71	extracto de levadura: 5	---
YDC**	glucosa: 10 carbonato de calcio: 20	extracto de levadura: 10	---
YDC-a	glucosa: 10 carbonato de calcio: 6.71	extracto de levadura: 10	---
Triptisim	glucosa: 2.5	peptona: 20	cloruro de sodio: 5 fosfato dipotásico: 2.5
GEL-PEP	gelatina: 20	peptona: 20	cloruro de sodio: 5 fosfato dipotásico: 2.5
LICO-PEP	licor de maíz: 15	peptona: 10	---

* Medios recomendados por DSMZ (www.dsmz.de/species/sp200462.html)

** Medio recomendado por Grimont & Grimont⁶.

De los medios evaluados, el medio 53 resultó ser el más favorable para lograr buen crecimiento y síntesis de producto. Con el medio 53-b también se alcanza crecimiento, (medido por Espectrofotometría), y síntesis del pigmento, no obstante, es menos favorable y en su preparación se presentan dificultades con la solubilidad del licor de maíz.

Los medios conteniendo carbonato de calcio en 6.71 mg/L, valor que corresponde al límite de solubilidad del carbonato como calcita, no permiten el crecimiento de la bacteria. La presencia en el medio de una concentración de carbonato mucho mayor (20 g/L), favorece el crecimiento y permite la síntesis del pigmento, con gran concentración de sólidos suspendidos (carbonato de calcio más biomasa), presentando inconvenientes durante la etapa de separación de la biomasa pigmentada. De esta manera, los medios 583, 583-a, YDC y YDC-a fueron descartados. Los me-

dios Triptisim, GEL-PEP y LICO-PEP no favorecen el crecimiento de la bacteria, por lo que también se descartaron.

Condiciones operativas para la síntesis de licopeno

Adicionalmente se estudiaron otras variables del proceso de síntesis empleando como medio de cultivo base el medio 53, el mejor de los medios evaluados. Las variables estudiadas fueron la edad de cultivo, la velocidad de agitación y la edad y concentración de inóculo, en los niveles ya definidos.

Los resultados obtenidos muestran que una cinética de cultivo de 5 días permite lograr el más alto rendimiento de biomasa y producto; una agitación de 150 rpm es adecuada para evitar la formación de agregados celulares y garantizar la homogenización del cultivo; con un inóculo cultivado durante 6 horas es posible garantizar que la bacteria ha alcanzado la fase exponencial de creci-

miento y por lo tanto se encuentra en el momento adecuado para su cultivo en matraz. Finalmente, un volumen de Inóculo de 0.2mL, el 1% de volumen de medio de cultivo, mostró ser el más favorable para lograr una buena concentración de producto.

Una vez definidas las condiciones operativas, se realizaron ensayos con el propósito de sustituir el digerido triptico de caseína-peptona, presente en el Medio 53, por peptona en presencia o no de fosfato diácido de potasio y una mayor concentración de la fuente de carbono; las nuevas com-

posiciones para el medio 53 se presentan en la tabla 2.

Para evaluar estos medios se empleó una cepa crecida en agar blando, la cual fue transferida a caja petri conteniendo Medio 53 (sólido); se mantuvo a temperatura ambiente y después de 3 días, se usó en la preparación del inóculo; el inóculo fue preparado con medio 53 (líquido) durante 6 horas asegurando que el cultivo alcanzara la fase exponencial de crecimiento. El volumen de inóculo fue 1% equivalente a 0.2 mL. Todos los ensayos se hicieron con una (1) réplica y la diferencia entre sus valores no excedió el 10 %

Tabla 2. Evaluación de peptona como sustituto del digerido de caseína-peptona en el medio 53 (concentraciones en g/L)

MEDIO	GLUCOSA	PEPTONA	EXTRACTO LEVADURA	NaCl	K ₂ HPO ₄	mg* caroteno/mL
1	10	10	5	5	0	1.156
2	10	10	5	5	2.5	1.308
3	12.5	20	5	5	0	1.212
4	12.5	20	5	5	2.5	1.988

* Estos resultados corresponden a un valor promedio entre experimento y una (1) réplica. la diferencia entre estos valores no fue mayor al 10%

Tanto para el inóculo como para el cultivo de la bacteria en matraz de 100mL, se emplearon las condiciones ya establecidas como adecuadas para lograr crecimiento y síntesis de producto, esto es T=28°C, pH inicial del medio de cultivo ajustado a 7.3, agitación 150 rpm. La bacteria fue cultivada durante 5 días con posterior extracción y cuantificación del pigmento.

Aún cuando todos los medios presentaron crecimiento y síntesis de producto, el medio 4 fue el más favorable. Este experimento dejó ver la posibilidad de sustitución del digerido comercial de caseína-peptona por peptona en presencia de fosfato diácido de potasio. A partir de su composición, dicho medio fue tomado como base para la formulación de la matriz final de experimentos

El arreglo experimental final fue un Diseño Central Compuesto, en el cual cada uno de los componentes del medio 4 fue evaluado en tres niveles diferentes, arrojando un total de 50 experimentos; como variable de respuesta se tomó la concentración de carotenos (mg/L) obtenida. Los

niveles a estudiar fueron (g/L): glucosa: 7.5, 10 y 12.5; peptona: 10, 15 y 20; extracto de levadura: 0, 5 y 10; NaCl: 0, 5 y 10; K₂HPO₄: 0, 2.5 y 5.

Tratamiento estadístico de los resultados experimentales.

Para el tratamiento estadístico de los resultados experimentales, se utilizó el programa DESIGN-EXPERT. Los resultados muestran como el extracto de levadura, NaCl y K₂HPO₄, son las variables de mayor efecto en la biosíntesis del producto; la presencia de extracto de levadura, como fuente de nitrógeno es particularmente importante. Glucosa y peptona deben estar presentes en el medio, pero pueden mantenerse en el nivel inferior evaluado; de este modo un medio compuesto por glucosa (g/L): 7.5, peptona: 10, extracto de levadura: 10, cloruro de sodio: 10 y fosfato dipotásico: 1, es adecuado para lograr una concentración máxima de producto de aproximadamente 2.85 mg carotenos/mL.

A continuación se presentan los resultados del ANOVA y el estudio de OPTIMIZACIÓN

El modelo seleccionado fue de tipo cuadrático. El análisis de varianza indica un porcentaje de ajuste del 73.9%, con variación en la respuesta debida a los factores, mas no al error experimental, lo cual se evidencia al considerar una distribución de probabilidad menor al 0.1%. El coeficiente de correlación fue del 67.48%.

Los términos que afectan en mayor grado la respuesta del sistema son la concentración de extracto de levadura, las interacciones extracto de levadura - extracto de levadura, glucosa-extracto de levadura, peptona-extracto de levadura.

ANOVA

Response: Factor	Carotenos Name	Transform: Units	Inverse Type	-1 Level	+1 Level
A	Glucosa	g/L	Numeric	7.50	12.50
B	Peptona	g/L	Numeric	10.00	20.00
C	Ext. lev.	g/L	Numeric	0.000	10.00
D	NaCl	g/L	Numeric	0.000	10.00
E	K ₂ HPO ₄	g/L	Numeric	0.000	5.00

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	1.99	17	0.12	10.01	< 0.0001
Residual	0.96	82	0.012		
Lack of Fit	0.88	25	0.035	26.10	< 0.0001
Pure Error	0.077	57	1.351E-03		
Cor Total	2.95	99			

Root MSE	0.11	R-Squared	0.6748
Dep Mean	0.62	Adj R-Squared	0.6073
C.V.	17.48	Pred R-Squared	0.4687
PRESS	1.57	Adeq Precision	17.767

Desire > 4

OPTIMIZACIÓN NUMÉRICA

Constrainte

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight
Glucosa	7.50..12.50	7.5	12.5	1	1
Peptona	10.00..20.00	10	20	1	1
Ext. levadura	0.00..10.00	0	10	1	1
NaCl	0.00..10.00	0	10	1	1
K ₂ HPO ₄	0.00..5.00	0	5	1	1
Carotenos	>= 2.82	0.848	2.824	1	1

Solutions

	Glucosa	Peptona	Ext. levadura	NaCl	K ₂ HPO ₄	Carotenos	Desirability
1	7.73	10.02	9.82	9.85	1.74	2.87	1.000
2	7.50	10.12	8.72	9.95	0.16	2.83	1.000
3	7.52	10.49	9.41	9.71	0.90	2.85	1.000
4	8.21	10.00	10.00	9.95	1.95	2.81	0.998

4 Solutions found

De las soluciones obtenidas se observa que los niveles para los distintos factores permanecieron aproximadamente constantes, siendo el K₂HPO₄ el que presentó una variación mayor manteniéndose dentro de sus niveles medio-bajo.

A partir de las superficies de respuesta, figuras 1 y 2, se observa como para altas concentraciones de extracto de levadura presentes en el medio de cultivo, la producción de licopeno se incrementa con el aumento o disminución de la concentración de NaCl y K₂HPO₄, respectivamente.

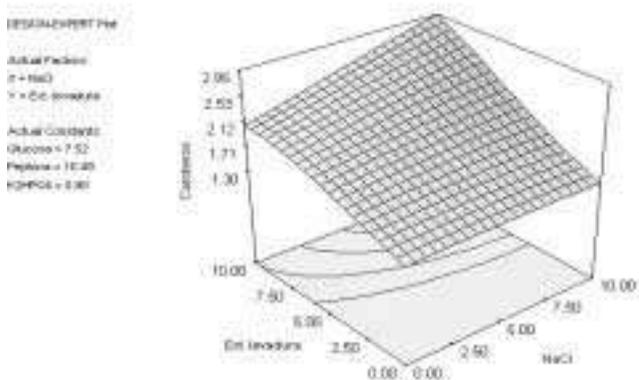


Figura 1.

Superficie de respuesta 3D, NaCl

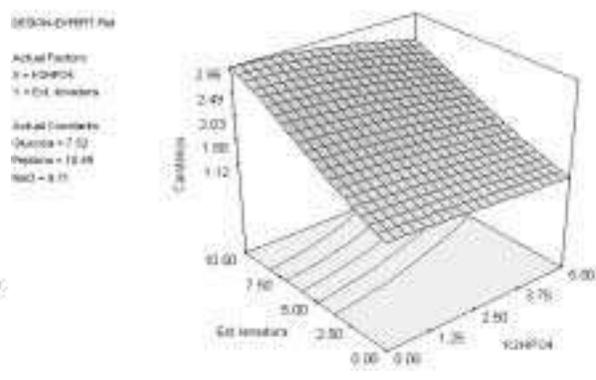


Figura 2.

Superficie de respuesta 3D, K₂HPO₄

Ensayos de Extracción

En la tabla 3 se muestran los solventes evaluados en cada ensayo y los resultados de absorbancia y concentración de producto obtenidos; cada uno de ellos corresponde a un valor promedio entre experimento y réplica; en nin-

gún caso estos valores difieren en más de un 10%. Por las características del proceso y el rendimiento de extracción, la separación y cuantificación de licopeno se hizo usando metanol como solvente de extracción.

Tabla 3. Evaluación de solventes para la extracción de carotenos

ENSAYO	SOLVENTE	OBSERVACIÓN	($\lambda=450\text{nm}$)	mg. carotenos mL
1	Lisis: NaOH 1N Solvente: Éter	Buen nivel de extracción de carotenos	0.191	0.76
2	Metanol	Buen rendimiento de extracción, sin lisis previa.	0.092	0.73
3	Metanol-Acetona (1:1)	Bajo rendimiento extracción.	0.057	0.45
4	Benceno	No es apropiado como solvente de extracción	—	—
5	Lisis: Metanol Solvente: Benceno	Formación de una emulsión blanca.	—	—
6	Hexano	No es apropiado como solvente de extracción	—	—
7	Lisis: Metanol Solvente: Hexano	Formación de emulsión. No se observa extracción.	—	—

Análisis y Caracterización de Producto

El producto obtenido del cultivo de *Clavibacter michiganensis* sb *michiganensis*, no logró purificarse completamente a partir de las técnicas emplea-

das. Los análisis realizados solo permitieron detectar la presencia de licopeno a partir de las señales características y espectros patrón propios de su estructura química, (ver figura 3).

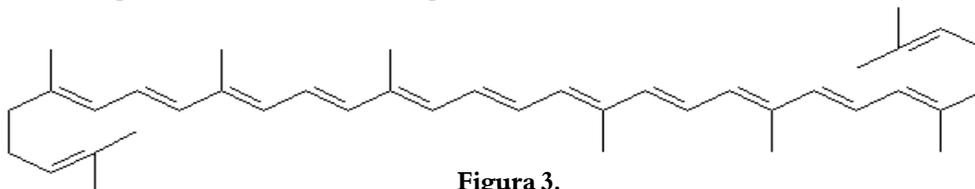


Figura 3.

Estructura química de Licopeno

Espectro de infrarrojo

El análisis se realizó después del proceso de extracción y purificación, para lo cual se empleó metanol como solvente. En la figura 4 se muestra el espectro infrarrojo; en él se aprecian las señales características de:

- Metanol: A 3313 cm^{-1} una banda ancha típica del grupo OH (señal 1) y en 1014 cm^{-1} se aprecia la tensión C-O típica de alcoholes prima-

rios (señal 7). La presencia del grupo $-\text{OCH}_3$ se evidencia a 2820 cm^{-1} (señal 3)

- Licopeno: En 2932 cm^{-1} aparecen las tensiones simétricas y asimétricas C-H alifático (señal 2), al igual que las flexiones CH_2 , CH_3 en 1400 y 1436 cm^{-1} (señal 5) y (señal 6); las flexiones fuera del plano $=\text{C-H}$ se ven a 800 cm^{-1} (señal 8) y en 1651 cm^{-1} se observa la tensión C=C (señal 4). Las señales anteriores permiten afirmar que el pigmento analizado es licopeno

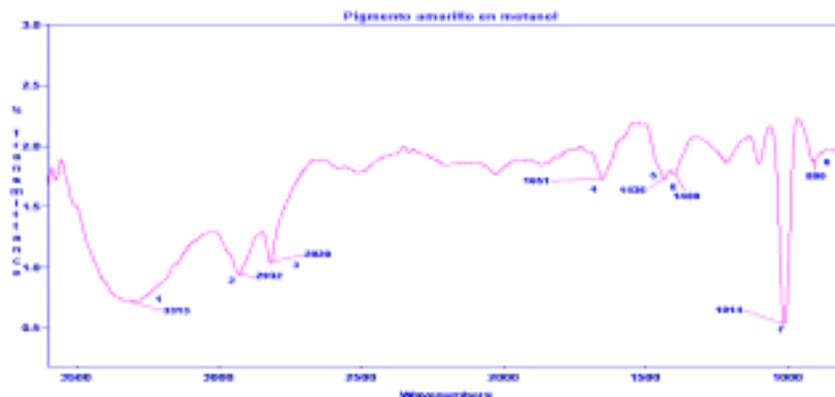


Figura 4.

Espectro de IR del pigmento amarillo en metanol

Espectro de resonancia magnética nuclear de protones

Este análisis se realizó luego de obtener el pigmento diluido en metanol comercial. La mezcla pigmento-metanol fue evaporada para obtener el pigmento completamente seco, este fue diluido en cloroformo deuterado para correr el espectro.

En la figura 5 se muestran señales correspondientes a la estructura del licopeno tomando como referencia el espectro de resonancia magnética nuclear del compuesto simulado con ACD Lab.

Entre 5 y 5.5 ppm (señal 2) se observa la señal generada por el hidrógeno de los enlaces dobles $=\text{C-H-}$ de la estructura. La presencia de los hidrógenos del CH_2 se aprecia alrededor de 4 ppm (señal 3) y en 2 ppm se pueden ver las señales generadas por los hidrógenos de los grupos CH_3 terminales, (señal 4). La señal 1 se debe al solvente.

Aún cuando la información obtenida no es suficiente para saber en qué proporción se encuentra el licopeno en el producto analizado, las señales características observadas permiten inferir sobre su presencia.

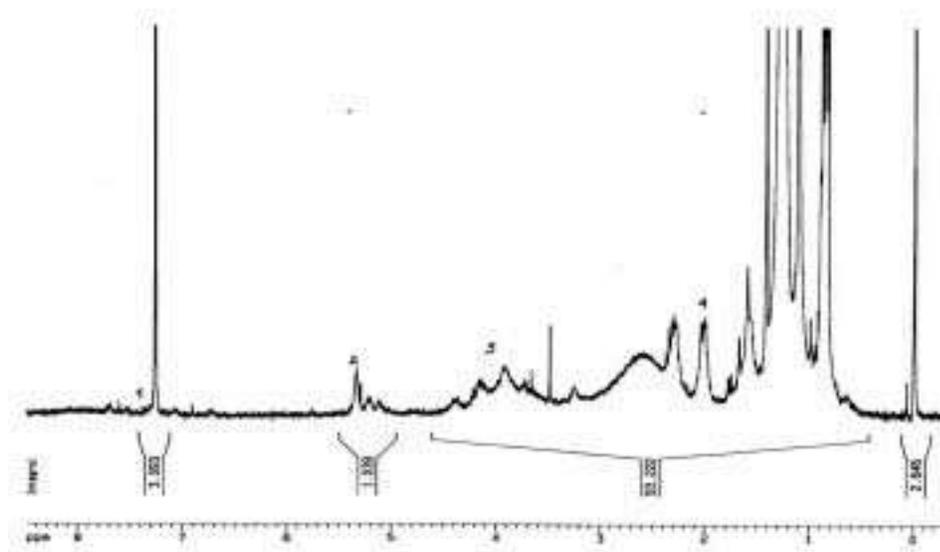


Figura 5.

Espectro de RMN del pigmento amarillo en cloroformo

CONCLUSIONES

De los medios de cultivo evaluados para la síntesis de licopeno a partir del cultivo de *Clavibacter michiganensis* sb. *michiganensis*, el medio compuesto por (g/L): glucosa: 7.5, peptona: 10, extracto de levadura: 10, cloruro de sodio: 10 y fosfato dipotásico: 1, permitió obtener la más alta concentración de producto, aproximadamente 2.85 mg carotenos/mL. De los solventes estudiados el más favorable fue metanol, obteniéndose buen rendimiento de extracción sin lisis previa del microorganismo.

De igual forma, las condiciones operativas más apropiadas para la síntesis de licopeno fueron: edad del inóculo: 6 horas, volumen de inóculo: 0.2mL, agitación: 150 rpm, temperatura 28°C, pH inicial ajustado a 7.3, cinética de cultivo: 5 días.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue parcialmente financiado por el Comité de Investigaciones CODI de la Universidad de Antioquia, referenciado con código MC00 – 1-19. Los autores agradecen el apoyo y colaboración del personal del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Giovannucci, E. L., Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willet, W. C., (1995) "Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer," *Journal National Cancer Institute*, 87 (23): 1767- 1776
2. Zhao, Z., Khachik, F., Richie, J., Cohen, L. (1998) "Lycopene uptake and tissue disposition in male and female rats" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218(2) : 109-114.
3. Bobek, P., Ozdin, L. Hromadova, M., (1998). "The effect of dried tomato, grape and apple pomace on the cholesterol metabolism and antioxidative enzymatic system in rats with hypercholesterolemia" *Nahrung-Food* 42(5) :317- 320
4. Conn, P. F., Schalch, W., Truscott, T. G. (1991). "The singlet oxygen and carotenoid interaction" *J. Photochem. Photobiol.* 11 : 41, 47
5. Saperstein S., Starr M. P. and Filfus J. A. (1954). Alterations in carotenoid synthesis accompanying mutation in *Corynebacterium michiganense*. *Journal of General Microbiology.* 10 : 85-92.
6. Grimont P; Grimont F. (1984). Genus *Corynebacterium*. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Baltimore. (Ed). N. R. Krieg. Williams and Wilkins. 2. pp 1261-1282
7. Karrer P; Jucker E. (1950). Carotenoids. ELSEVIER Publishing Company Inc. Holanda. 384 P
8. Bauernfeind J. C. (1981). Carotenoids as colorants and Vitamin A precursors: Technological and nutritional applications. Academic press. EE.UU., 938 P

Fecha de Recibo: Septiembre 16 de 2003

Fecha de Aceptación: Octubre 14 de 2003