

## **TRABAJO PRACTICO NUTRICION MICROBIANA**

### **Diseño de Medios de Cultivo**

La preparación de medios para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos.

Los componentes de los medios constituyen los efectores externos de naturaleza química que desempeñan un rol esencial en los procesos ya que deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y de formación de productos y además suministrar energía para biosíntesis y mantenimiento celular.

No obstante que los microorganismos varían considerablemente respecto de los nutrientes que pueden necesitar es posible efectuar la distinción de las siguientes categorías de componentes: a) Macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg; b) Micronutrientes o elementos trazas representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro; y c) Factores de crecimiento, que son generalmente componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc..

Los medios pueden clasificarse, considerando la naturaleza química de los componentes, en 1) medios sintéticos o medios químicamente definidos, y 2) medios complejos en cuya composición intervienen sustancias de origen animal o vegetal como peptonas, extracto de levadura, macerado de maíz, harina de soja, etc. que aportan las sustancias fundamentales ya mencionadas, pero que son químicamente indefinidas y de composición variable.

En el estudio de los medios de cultivo es conveniente considerar en primer lugar el diseño para tratar a continuación la formulación y optimización de los mismos.

### ***Diseño***

El diseño de un medio de fermentación tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. Con tal objeto se debe tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a ser empleados como son los requerimientos nutricionales del microorganismo y algunos específicos del proceso, la disponibilidad real de los componentes y consideraciones sobre las materias primas. Otros aspectos que son también importantes se refieren a todos los procesos y operaciones previos y posteriores a la etapa de fermentación y al conocimiento de los mecanismos bioquímicos que regulan la formación de algunos productos.

### ***Requerimientos nutricionales***

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que corresponde a los microorganismos que obtienen el carbono del CO<sub>2</sub> como las algas y algunas bacterias, ó heterotrófico que lo poseen organismos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Otro factor esencial esta determinado por las condiciones del cultivo, si es aerobio o anaerobio. El O<sub>2</sub> es el oxidante mas común en el metabolismo energético. En la ausencia de éste, el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ó SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> son utilizados como aceptores

de electrones por algunas bacterias. Otras protistas obtienen su energía, en condiciones anaerobias por reacción de oxidación-reducción realizadas sobre compuestos orgánicos. Las fuentes de carbono cumplen también el rol de ser fuente de energía.

Otro requerimiento nutricional está constituido por las fuentes de nitrógeno que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Para la síntesis de proteína se requieren en general L-aminoácidos, aunque también son necesarios algunos aminoácidos de la serie D como D-alanina y D-aspártico para su incorporación a la pared de la célula. En algunos casos se requieren también péptidos de histidina.

Los requerimientos de otros macronutrientes como el P y el S son suministrados en forma de fosfatos y sulfatos (ó aminoácidos azufrados). El fósforo se incorpora en ácidos nucleicos, y polímeros celulares. El S es asimilado para la síntesis de aminoácidos azufrados, y además se necesita para la biotina, coenzima A, tiamina y otros componentes.

Los requerimientos de K y Mg son también esenciales. Una parte importante del primero está unida al RNA de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento. El ion K actúa como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ion Mg es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo. Tanto el K como el Mg se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato.

Con respecto a los micronutrientes se distinguen 2 categorías: a) Los que son frecuentemente esenciales para el crecimiento como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn y b) los que son raramente esenciales como B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, etc.. En general los requerimientos de trazas de elementos son conocidas cualitativamente. A veces es difícil demostrar un requerimiento de un micronutriente porque generalmente está presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales. Los requerimientos de estos compuestos pueden aumentar varias veces cuando el cultivo ha estado sujeto a "strees", como por ejemplo por aumento de temperatura por encima de un valor óptimo.

Los requerimientos de factores de crecimiento comprenden ciertos aminoácidos y vitaminas del grupo B como tiamina, riboflavina, ácido pantotético, niacina, etc., que representan para muchas bacterias y levaduras factores esenciales en los medios sin los cuales no se produce crecimiento celular. La mayor parte de las vitaminas son constituyentes de co-enzimas. Otros factores de crecimiento son las purinas, poliaminas, putrescinas, etc..

En algunos procesos existe la necesidad de efectuar otros agregados, aparte de los nutrientes requeridos por los microorganismos y que representan los requerimientos específicos del proceso considerado.

Un ejemplo es el caso de los precursores que constituye la base de una molécula que debe ser sintetizada por el microorganismo, como el ácido fenil acético para la producción de penicilina. Otro ejemplo es el agregado de cloruros o bromuros en el caso de algunos antibióticos como cloro y bromotetraciclinas producidas por el *Streptomyces aureofaciens*. El agregado de sulfito, en el proceso de fermentación alcohólica, que favorece la formación de glicerol, es otro ejemplo de un requerimiento específico.

El diseño correcto tiene que ver con las características bioquímicas propias y evolución de los parámetros de cada proceso. Por ejemplo, un proceso caracterizado por un descenso continuo de pH, debido al uso de una sal de amonio como fuente de nitrógeno, obliga a considerar en su diseño algún agregado que no corresponda a una exigencia nutricional, como es el caso del control de pH del mismo. Este puede efectuarse por agregados al medio de agentes

"buffer" como mezclas de fosfatos o de carbonato de calcio o como mas generalmente se hace, con agregados periódicos de soluciones alcalinas que pueden efectuarse en forma mas conveniente mediante un control automático de pH. El diseño de un medio específico para la producción de ácido cítrico debe considerar la influencia negativa que para el proceso tiene un exceso de hierro en su composición; por lo tanto dicho medio debe diseñarse de manera tal que su preparación (a partir de diversas materias primas) considere una eliminación total del hierro y posterior agregado del mismo en cantidades controladas.

### ***Disponibilidad de los componentes***

Aparte de su presencia en el medio de cultivo, los nutrientes deben estar disponibles para ser usados por la célula.

Es importante mencionar la disponibilidad correspondiente a iones metálicos cuya concentración es modificada por quelación, ya que muchos constituyentes del medio y productos del metabolismo actúan como agentes complejantes o precipitantes, por ejemplo aminoácidos, hidroxiacidos, hidróxidos, y los aniones fosfato y carbonato.

Por lo tanto, con el objeto de controlar su concentración y prevenir la precipitación de los iones metálicos, es necesario o esencial quelar el ion mediante algún agente quelante agregado, como el EDTA o ácido cítrico.

En medios complejos de uso industrial la situación es aún mas complicada ya que existe una gran variedad de sustancias orgánicas, las cuales pueden quelar, secuestrar o absorber iones metálicos reduciendo la concentración iónica disponible. Entre dichos compuestos podemos citar: aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, polifenoles, polifosfatos y materiales coloidales. En general se puede decir que todo material insoluble presente en el medio de cultivo va a tener una determinada capacidad de unión a elementos metálicos disminuyendo su concentración efectiva, como ocurre también con los aminoácidos y proteínas que tienen los grupos reactivos R-COO-, RHN-, RS-, RO, que son los mas importantes. La dinámica de formación del complejo está determinada por la constante de equilibrio de formación del complejo metal-ligando, y por la velocidad a la cual el equilibrio es obtenido. La constante de equilibrio de la formación de complejos es prácticamente independiente de la naturaleza del ligando, ya que depende particularmente del ion metálico. Se puede hacer una lista de términos de valores decrecientes de la constante de equilibrio como sigue:  $Fe^{3+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{3+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} = Ca^{2+} = Sr^{2+} > Ba^{2+} > Na^{+} > K^{+}$  y de la cual se puede deducir, por ejemplo, que el ion  $Cu^{2+}$  estará fundamentalmente como complejo mientras que  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  y  $K^{+}$  estarán principalmente en forma de iones metálicos libres.

Por otro lado la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio tiene también una serie de orden decreciente de velocidades de acuerdo al ion:  $Sr^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} > Ni^{2+}$ . De ambas consideraciones surge por ejemplo que cuando se alcanza el equilibrio el ion  $Ca^{2+}$  estará casi siempre libre para ser utilizado y si esta complejado se hará rápidamente disponible, en cambio el  $Mg^{2+}$  estará generalmente libre pero si esta complejado se hará disponible muy lentamente. En la misma forma se puede deducir que el  $Co^{2+}$  estará fundamentalmente en forma complejada siendo disponible además a muy baja velocidad. Por esa razón ese elemento es potencialmente limitante.

En conclusión, es importante tener en cuenta la naturaleza de los compuestos orgánicos que tienen capacidad para actuar como ligandos, y sobre todo el ion metálico considerado, ya que la concentración libre de este es lo que interesa.

### ***Materias primas fundamentales***

Los componentes empleados en la industrias de fermentación son generalmente complejos, siendo importante considerar diferentes aspectos como el costo de los mismos, la disponibilidad y la estabilidad en su composición química. Si tenemos en cuenta que el costo de los nutrientes representa entre al 10 y el 60% del costo total de muchos productos obtenidos por fermentación, se hace prioritario disminuir el costo de los medios.

Las materias primas mas importantes corresponden a fuentes de carbono y de nitrogeno.

Las fuentes de carbono pueden ser: 1) Hidratos de carbono como glucosa o dextrosa, sacarosa, lactosa, almidón, dextrina; 2) Alcoholes como el glicerol y manitol; y 3) Hidrocarburos como hexadecano, octadecano y otros. Son muy importantes también por su disponibilidad y costo reducido otras materias primas que contienen hidratos de carbono como granos, melazas, celulosas, suero de queso, etc. También se pueden emplear otros subproductos o efluentes de industrias que por su contenido en fuentes de carbono son interesantes para algunos procesos como las vinazas de destileria, alpechin y residuos sulfíticos, que son sin embargo solamente útiles para procesos de producción de biomasa destinados al consumo animal, ya que si bien contienen hidratos de carbono y otras fuentes de carbono asimilables por los microorganismos, también contienen muchas impurezas que impiden su utilización en otros procesos por las dificultades y costo elevado que presentan las operaciones de separación y purificación de los productos.

Las fuentes de nitrógeno de naturaleza inorgánica mas comunes son el amoniaco o las sales de amonio. Las orgánicas están representadas por varios productos, como ser: 1) Hidrolizados de proteínas (Peptonas) que son obtenidas por hidrólisis ácida o enzimática de distintas fuentes proteicas como carne de diferentes órganos y animales, pescado, caseína, gelatina, harina de soja, algodón, girasol, etc.. Mediante ajuste de la relación enzima-sustrato y variando tiempo de hidrólisis es posible variar el tamaño de la cadena de polipeptidos. Aparte de su función como fuente nitrogenada, las peptonas aportan algunas vitaminas y sales inorgánicas como fosfatos y suministran también algunos micronutrientes como Ca, Zn, Fe y Cu. 2) Extracto de carne, que se obtiene por extracción acuosa y concentración posterior variando su tipo de acuerdo a la calidad de carne, tiempo de extracción y temperatura de la misma. 3) Extracto de levadura, que es disponible en forma de pasta o polvo, y puede ser obtenida mediante autólisis o plasmólisis de la levadura, es básicamente una mezcla de aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en H<sub>2</sub>O y carbohidratos. 4) Extracto de malta, que es el extracto soluble en H<sub>2</sub>O de la malta de la cebada y 5) "Cornsteep", el agua de maceración de la industria del maíz que tiene mucha importancia por su utilización como componente esencial de los medios para la producción de varios antibióticos y enzimas.

Es muy importante también la correcta elección de una determinada fuente cuando se presentan varias alternativas posibles. En este sentido deben considerarse los costos, la disponibilidad y el problema de impurezas que puede acompañar a las distintas materias primas utilizadas.

### ***Formulación***

La formulación tiene que ver con los aspectos cuantitativos de los medios, es decir debe establecer las concentraciones de cada componente a ser utilizadas.

Una primera aproximación con respecto a las cantidades a utilizar de las diversas fuentes lo da el conocimiento de la composición de biomasa del microorganismo a ser empleado. Una composición elemental y típica de la biomasa es (en % de peso seco): Carbono, 46-48; Nitrógeno, 7-12; Fósforo, 1-3; Azufre, 0.5-1.0; Mg, 0.5-1. Es decir, que si queremos formular un

medio para producir una determinada cantidad de biomasa debemos proveer las distintas fuentes que aseguren como mínimo las cantidades de elementos que deben ser suministrados. La composición de un medio mínimo basado en este principio, que además tiene en cuenta los requerimientos de las fuentes de energía, figura en la tabla 3, que ha sido calculada por Pirt para la producción de 10 g/l de *Klebsiella aerogenes*.

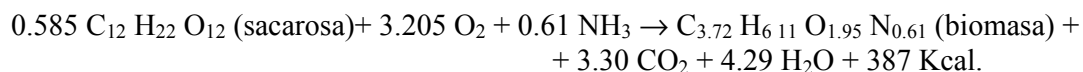
**Tabla 3.** Composición de un medio mínimo para *Klebsiella aerogenes* (Adaptado de Pirt)

Componente	Elemento provisto o función	Masa del Componente (g)
Glucosa	C, Energía	22.7
NH <sub>4</sub> Cl	N	4.37
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P + K	1.13
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	S + Mg	0.232
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Ca	0.011
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Fe	0.007
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Mn	0.002
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Zn	0.002
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Cu	0.0004
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Co	0.0004
EDTA, Sal disódica dihidrato	Agente quelante	0.394
H <sub>2</sub> O (destilada)		1,000 ml

Por el conocimiento de la estequiometría de crecimiento y de formación del producto, es posible formular adecuadamente un medio de cultivo. En general podemos escribir para cualquier proceso de fermentación:



Supongamos que queremos formular un medio para la producción de biomasa de levadura de panificación. En este caso se puede establecer la siguiente ecuación basada en la estequiometría:



La ecuación anterior representa así la formación de 100 g de biomasa a partir de 200 g de sacarosa. Debe aclararse que en la fórmula de la levadura que representa la composición centesimal de la misma faltan los elementos menores como el P, el S y el Mg por lo cual la suma no da 100 g sino 90.46. Es conveniente utilizar en lugar de la fórmula centesimal la correspondiente a la fórmula mínima que resulta de dividir el porcentaje de cada elemento por 3.72, o sea haciendo uno al carbono. En este caso se considera que toda la fuente de carbono se emplea para la formación de biomasa y de CO<sub>2</sub> que se desprende sin formación de otros productos.

En la misma forma se pueden establecer balances de materia para otras reacciones que incluyan productos y deducir de las mismas las cantidades de biomasa y productos que se pueden obtener a partir de una determinada cantidad de fuentes de carbono y de nitrógeno. Las otras fuentes de elementos menores y factores no son necesarios de incluir en las ecuaciones.

Aplicando este criterio podemos establecer entonces que para obtener una determinada concentración de biomasa, por ejemplo 30 g/l, debemos formular el medio como mínimo con 60 g/l de fuentes de carbono asimilable, que es en el caso anterior la sacarosa. Con respecto a las fuentes de nitrógeno, esta debe estar en concentración tal como para satisfacer la ecuación anterior, que es 0.61 moles de  $\text{NH}_3$  o sea 10.37 g, lo que representa 8.54 g de  $\text{N}_2$ . Ya tenemos por lo tanto la cantidad de la otra fuente fundamental a ser agregada. Del conocimiento de la composición centesimal de otros componentes menores podemos establecer así las cantidades a agregar.

Ahora bien, sabemos por otra parte que la levadura necesita para crecer algunas vitaminas del grupo B como la biotina, tiamina, ácido pantoténico, etc. Esas vitaminas deben estar por lo tanto presentes en el medio. Como el proceso de producción de levadura es un proceso industrial que interesa desarrollar con costos de producción mínimos, es conveniente estudiar las fuentes de carbono, nitrógeno y de vitaminas y minerales más económicos y disponibles que podamos encontrar. Surge así la elección lógica de las melazas de caña de azúcar o de remolacha que reúnen la mayor parte de las condiciones.

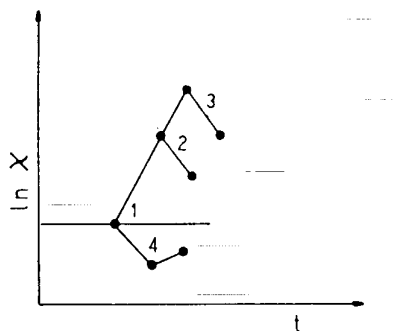
Mediante el conocimiento de los coeficientes de rendimiento para la formación de biomasa y producto y los valores de la energía de mantenimiento será posible establecer los requerimientos de las fuentes de carbono necesarios para formular un medio.

### ***Optimización***

Pueden ocurrir situaciones en las cuales sea imperativo la optimización de los medios de cultivo. Entre ellas podemos mencionar las siguientes: 1) No existencia de información respecto a coeficientes de rendimiento de macro y micro elementos para el cultivo del microorganismo determinado. 2) Existencia de limitaciones nutricionales ocultas, especialmente de microelementos y factores de crecimiento. 3) Uso de medios de cultivo conteniendo elementos en exceso respecto de los requerimientos nutricionales del microorganismo en cuestión, que pueden causar inhibición del crecimiento. 4) Ensayo de sustancias estimulantes, activadoras e inhibidoras del crecimiento y formación del producto. 5) Empleo de fuentes nutricionales no convencionales.

La metodología más elemental consiste en realizar experimentos, en los cuales se varía la concentración del componente a ensayar manteniéndose constante las concentraciones de los demás ingredientes. Para organismos aerobios generalmente se utiliza como sistema de cultivo erlenmeyers agitados. En este caso, se analiza el efecto de la variable escogida sobre la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa obtenida.

Si bien el procedimiento anterior es simple, es evidente que hace falta una gran cantidad de trabajo preliminar ya que el operador no conoce de antemano que nutriente es el limitante del crecimiento. Cuando son varios los posibles nutrientes limitantes el método resulta poco práctico. Por otra parte puede ocurrir que la respuesta obtenida al variar la concentración de un componente dependa de los niveles de los otros, o sea, se produzca interacción entre componentes. Se puede mejorar mucho la optimización en batch empleando técnicas estadísticas o utilizando sistemas continuos con pulsos de componentes. Utilizando cultivos continuos (tema que se verá en el desarrollo de este curso) es posible obtener un cultivo limitado por un solo factor o sustrato a lo largo de todo el experimento, pudiéndose conocer por lo tanto el efecto que su variación ejerce sobre el cultivo al mantenerse los demás componentes constantes. En la fig. 1 se muestra la optimización de un medio lograda por el método de los pulsos trabajando con un cultivo continuo y en el cual se grafica la variación de la concentración de biomasa en función del tiempo después del pulso de un componente dado.



**Figura 1.** Optimización de medios de Fermentación. 1. Nutriente no limitante. 2. Nutriente limitante. 3. Nutriente limitante a mayor concentración. 4. Nutriente tóxico.

### ***Modificación de la calidad nutricional de un medio de cultivo durante la esterilización***

Como ya dijimos anteriormente, los medios de fermentación utilizados en la industria son casi siempre complejos y a menudo con sólidos en suspensión, de manera tal que los cambios que se producen durante la esterilización pueden ser importantes. A veces puede haber modificaciones beneficiosas o perjudiciales dependiendo del tiempo de esterilización.

Existen casos en los cuales si se prolonga la esterilización 50 a 60 min se producen perdidas de rendimiento que llegan hasta el 65% con respecto al medio normal. En ciertos casos cuando el tiempo es solamente de 15-20 min se puede producir un efecto beneficioso.

La naturaleza de las interacciones que tienen lugar entre los componentes de un medio, durante la esterilización por calor, dependerá no solamente de la naturaleza de los componentes sino también de la temperatura, duración del calentamiento, pH del medio, y de la agitación. Un ejemplo típico de interacción es la reacción de Maillard que tiene lugar entre los grupos carbonilos de los azúcares con los grupos amino de proteínas, aminoácidos, etc. Se forman así productos de condensación con lo cual se inactivan significativas cantidades de carbohidratos y nitrógeno amínico. Por ese motivo es necesario que los carbohidratos se esterilicen por separado de los compuestos nitrogenados orgánicos.

Los aminoácidos y factores de crecimiento son muy lábiles al calor. Entre los aminoácidos, el triptofano, glutamina, asparagina, y entre las vitaminas hidrosolubles, la tiamina, riboflavina y piridoxina son las mas susceptibles de sufrir descomposición. En todos estos casos es aconsejable disolverlas separadamente en pequeños volúmenes de H<sub>2</sub>O y luego esterilizarlas por filtración.

Las sales de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se deben autoclavar a pH 7 o menor, si no el amonio se volatiliza. En medios químicamente definidos se pueden observar perdidas importantes de magnesio, potasio, amonio, sodio y fosfatos por precipitación de sales poco solubles como MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>, MgKPO<sub>4</sub> y MgNaPO<sub>4</sub>. Es importante por lo tanto autoclavar las sales de calcio y magnesio aparte de los fosfatos.

## PARTE EXPERIMENTAL

**OBJETIVO:** poner de manifiesto el efecto de los componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento celular

**MICROORGANISMO:** se empleará una cepa de la levadura *Kluyveromices lactis*

**MEDIO DE CULTIVO:**

Medio base:	Glucosa .....	4.0 g/l
	Urea.....	1,00 “
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,60 “
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,06 “
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,36 “
	Ácido Cítrico	0,27
	0,5 ml solución madre de micronutrientes A	
	0,5 ml solución madre de micronutrientes B	
	0.5 ml solución madre de vitaminas	
	pH: 5.50 antes de esterilizar	

Solución madre de micronutrientes A:

Acido cítrico	0.60 g.L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.15 g.L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	3.00 g.L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5.00 g.L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	15.0 g.L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.75 g.L <sup>-1</sup>

Esta solución se lleva a pH: 2 con SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>

Solución madre de micronutrientes B:

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.65 g.L <sup>-1</sup>
IK	0.1 g.L <sup>-1</sup>
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	0.1 g.L <sup>-1</sup>

Solución madre de vitaminas:

Acido Fólico	6 mg.L <sup>-1</sup>
Inositol	6 mg.L <sup>-1</sup>
Biotina	6 mg.L <sup>-1</sup>
Pantotenato de Ca	0.80 g.L <sup>-1</sup>
Acido p-amino benzoico	0.80 g.L <sup>-1</sup>
Riboflavina	0.80 g.L <sup>-1</sup>
Piridoxina	1.60 g.L <sup>-1</sup>

Esta solución se esteriliza por filtración

Medio 2: Medio base sin solución de vitaminas, con el agregado de Extracto de levadura (0,5 g/l)

Medio 3: Medio base sin Urea



Medio 4: Medio base con glucosa 2 g/l.

Los ensayos se realizarán en erlenmeyer de 500 ml conteniendo cada uno 100 ml de los medios antes descriptos.

Con el objeto de observar el efecto del suministro de  $O_2$  sobre el desarrollo celular se empleará un erlenmeyer adicional el cual contendrá 300 ml de medio base.

Al iniciar el proceso se inocularán al 10%, en forma estéril, todos los erlenmeyers con una suspensión de levaduras en  $H_2O$ . Desde el momento de la siembra y durante las 7 hs siguientes, se tomarán de cada erlenmeyer, muestras en forma esteril (una cada dos horas) sobre las que efectuarán medidas de pH y se seguirá el desarrollo microbiano por medidas de densidad óptica, realizando las diluciones correspondientes.

Con los datos obtenidos se construirá una gráfica de DO vs t para cada uno de los cinco medios de cultivo y se analizarán los resultados.