

**OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA DE LA CEPA *Pseudomonas putida* UA 44 AISLADA DEL SUELO
BANANERO DE URABA –ANTIOQUIA**

CAMILO ANDRÉS BECERRA MEJÍA

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE ROCESOS
MEDELLÍN**

2007

**OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA DE LA CEPA *Pseudomonas putida* UA 44 AISLADA DEL SUELO
BANANERO DE URABA –ANTIOQUIA**

CAMILO ANDRÉS BECERRA MEJÍA

Proyecto de grado para optar al título de Ingeniero de Procesos

Asesor

**MRes. Valeska Villegas Escobar
Docente Ingeniería de Procesos**

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLÍN**

2007

2

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín 11 de octubre de 2007

AGRADECIMIENTOS

VALESKA VILLEGAS ESCOBAR, Docente del departamento de ingeniería procesos de la universidad EAFIT, por su asesoría y acompañamiento en la realización de este proyecto

CATALINA GIRALDO ESTRADA, Docente del departamento de ingeniería de procesos de la Universidad EAFIT.

EDGAR DARIO ARBELÁEZ, Coordinador de los laboratorios de ingeniería de procesos de la Universidad EAFIT.

JOHN JAIRO ESTRADA, Auxiliar de los laboratorios de ingeniería de procesos.

LUZ DEISY MARÍN, Docente del departamento de ingeniería de procesos.

SIGIFREDO ANTONIO CÁRDENAS, Analista técnico del laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT, por su gran colaboración durante la elaboración del proyecto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	14
RESUMEN	16
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
2. MARCO TEORICO	20
2.1 QUÉ SON LAS RIZOBACTERIAS?	20
2.2 <i>Pseudomonas putida</i>	21
2.3 DESARROLLO DE MEDIOS DE CULTIVO	24
2.3.1 Diseño de medios de cultivo	25
2.3.2 Formulación	26
2.3.3 Optimización	26
2.4 ANTECEDENTES	30
3. MATERIALES Y EQUIPOS	32
3.1 MATERIALES	33
3.2 EQUIPOS	34
4. METODOLOGÍA	35
4.1 UBICACIÓN:	35
4.2 MICROORGANISMO	35
4.3 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	35
4.3.1 Medio definido (MD)	35
4.3.2 Medio Semicomplejo	37
4.4 TECNICAS ANALÍTICAS	38
4.4.1 Curva de calibración	38
4.4.2 Medición de biomasa por densidad óptica	40
4.4.3 Medición de UFC/mL	40

4.4.4	Determinación de azúcares reductores	41
4.5	FERMENTACIONES SUMERGIDAS CON <i>P. putida</i> UA 44	42
4.6	OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DEFINIDO	43
4.7	PARÁMETROS CINÉTICOS	43
4.7.1	Rendimiento observado de sustrato en biomasa (Y'_{xs})	43
4.7.2	Velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max})	44
4.8	DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
4.9	MODELO MATEMÁTICO	45
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1	Diseño y formulación del medio de cultivo basal	48
5.2	OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DEFINIDO	50
5.2.1	Primer paso	50
5.2.2	Segundo paso	56
5.2.3	Medio óptimo	61
5.3	COMPARACION MD OPTIMIZADO Y EL TSB.	71
5.3.1	Crecimiento de la biomasa	71
5.3.2	Formación de colonias	75
5.3.3	Consumo de sustrato	76
5.3.4	Costos	78
5.4	MODELO MATEMÁTICO	79
5.4.1	Biomasa	79
5.4.2	Sustrato	82
	CONCLUSIONES	86
	RECOMENDACIONES	88
	BIBLIOGRAFÍA	89
	CIBERGRAFÍA	97
	ANEXOS	98

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Constituyentes inorgánicos de las bacterias	23
Tabla 2. Composición elemental de las bacterias	23
Tabla 3. Etapas y tópicos relacionados para el desarrollo del medio de cultivo	24
Tabla 4. Técnicas de optimización de medios de cultivo	28
Tabla 5. Composición del TSB	37
Tabla 6. Diluciones de la curva de calibración de concentración de biomasa	39
Tabla 7. Medio de cultivo definido basal	48
Tabla 8. Primer paso de optimización	51
Tabla 9. Rendimiento de sustrato en biomasa y concentración final de biomasa y en el primer tamaño de paso	54
Tabla 10. Segundo paso de optimización	57
Tabla 11. Rendimiento de sustrato en biomasa y concentración final de biomasa en el segundo tamaño de paso	59
Tabla 12. Composición del MD optimizado	61
Tabla 13. Velocidad de máxima de crecimiento de la bacteria <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en la optimización del MD	65
Tabla 14. Concentración de biomasa a las 20 horas de la <i>P. putida</i> UA 44 en la optimización del MD	66
Tabla 15. UFC/mL de la <i>P. putida</i> UA 44 en la optimización del MD	67
Tabla 16. Rendimiento de sustrato en biomasa para <i>P. putida</i> UA 44 en el proceso de optimización del MD	70
Tabla 17. Concentración de biomasa a las 20 horas de la <i>P. putida</i> UA 44 en el MD optimizado y en el TSB	73

Tabla 18.	Velocidad de máxima de crecimiento de la bacteria <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en el medio definido optimizado y en el TSB	74
Tabla 19.	UFC/mL de la <i>P. putida</i> UA 44 en el MD optimizado y en el TSB	76
Tabla 20.	Rendimientos de sustrato en biomasa para <i>P. putida</i> UA 44 en el MD optimizado y en el TSB	77
Tabla 21.	Costo de 1 L de medio de cultivo MD y TSB	78
Tabla 22.	Costo por gramo de biomasa	79
Tabla 23.	Parámetros del modelo matemático de la cinética de crecimiento de la <i>P. putida</i> UA4 4 en el MD optimizado	80
Tabla 24.	Parámetros del modelo matemático de la cinética de crecimiento de la <i>P. putida</i> UA 44 en TSB	81
Tabla 25.	Parámetros del modelo matemático del consumo de sustrato de la <i>P. putida</i> UA44 en el MD optimizado	82
Tabla 26.	Parámetros del modelo matemático del consumo de sustrato de la <i>P. putida</i> UA 44 en el TSB	83

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Curva de calibración de biomasa con respecto a la absorbancia	40
Gráfica 2. Cinética de crecimiento de la <i>P. putida</i> UA 44 en el primer paso de optimización del MD	53
Gráfica 3. Consumo de glucosa de la <i>P. putida</i> UA 44 en el primer paso de optimización del MD	53
Gráfica 4. UFC/mL de la <i>P. putida</i> UA 44 en el primer paso de optimización del MD	54
Gráfica 5. Cinética de crecimiento la <i>P. putida</i> UA 44 en el segundo paso de optimización del MD	58
Gráfica 6. UFC/mL de la <i>P. putida</i> UA 44 en el segundo paso de optimización del MD	60
Gráfica 7. Consumo de glucosa de la <i>P. putida</i> UA 44 en el segundo paso de optimización del MD	60
Gráfica 8. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato de la <i>P. putida</i> UA 44 MD optimizado	62
Gráfica 9. Cinética de crecimiento de la <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en la optimización del MD	63
Gráfica 10. Linelización de la cinética de crecimiento de la <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en la optimización del MD	64
Gráfica 11. Varianza de la velocidad de crecimiento de la <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en la optimización del MD	65
Gráfica 12. Varianza de la concentración de biomasa de la <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en el la optimización del MD	66
Gráfica 13. Varianza de las UFC/mL de la <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en la optimización del MD	68

Gráfica 14.	Varianza del rendimiento de sustrato en biomasa para <i>Pseudomonas putida</i> UA44 en el proceso de optimización del MD	69
Gráfica 15.	Consumo de sustrato de la <i>P. putida</i> UA 44 en el proceso de optimización del MD	70
Gráfica 16.	Cinética crecimiento de la <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en el MD optimizado y en el TSB	72
Gráfica 17.	Linealización de la cinética de crecimiento de la <i>Pseudomonas putida</i> UA44 en el MD optimizado y en el TSB	73
Gráfica 18.	Varianza de la concentración de biomasa de la <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en el MD optimizado y en el TSB	74
Gráfica 19.	Varianza de la velocidad de crecimiento de la <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en el MD optimizado y en el TSB	75
Gráfica 20.	Varianza de UFC/mL de la <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en el MD optimizado y en el TSB	75
Gráfica 21.	Cinética de crecimiento y consumo de sustrato en ambos medios de la <i>P. putida</i> UA 44	76
Gráfica 22.	Varianza del Rendimientos de sustrato en biomasa para <i>Pseudomonas putida</i> UA 44 en el MD optimizado y en el TSB	77
Gráfica 23.	Comparación entre los datos experimentales y calculados de la producción de biomasa de la <i>P. putida</i> UA 44 en el MD optimizado	80
Gráfica 24.	Comparación entre los datos experimentales y calculados de la producción de biomasa de la <i>P. putida</i> UA 44 en el TSB	81
Gráfica 25.	Comparación entre los datos experimentales y calculados del consumo de sustrato de la <i>P. putida</i> UA 44 en el MD optimizado	83
Gráfica 26.	Comparación entre los datos experimentales y calculados del consumo de sustrato de la <i>P. putida</i> UA 44 en el TSB	84

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Tinción de Gram de la <i>Pseudomonas putida</i> UA44	43

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Determinación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)	99
ANEXO B. Determinación de sacarosa por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)	101
ANEXO C. Tinción de Gram	103
ANEXO D. Análisis estadístico de la glucosa en el primer tamaño de paso	104
ANEXO E. Análisis estadístico del sulfato de amonio en el primer tamaño de paso	106
ANEXO F. Análisis estadístico del sulfato de magnesio en el primer tamaño de paso	108
ANEXO G. Análisis estadístico de la glucosa en el segundo tamaño de paso	110
ANEXO H. Análisis estadístico del sulfato de amonio en el segundo tamaño de paso	112
ANEXO I. Análisis estadístico del sulfato de magnesio en el segundo tamaño de paso	114
ANEXO J. Análisis estadístico de la concentración de biomasa en la optimización del medio de cultivo definido	116
ANEXO K. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento en la optimización del medio de cultivo definido	118
ANEXO L. Análisis estadístico de UFC/mL en la optimización del medio de cultivo definido	120
ANEXO M. Análisis estadístico del rendimiento de sustrato en biomasa en la optimización del medio de cultivo definido	122
ANEXO N. Análisis estadístico de la comparación de la velocidad de crecimiento entre el medio definido optimizado y el medio TSB	124

ANEXO O. Análisis estadístico de la comparación de concentración de biomasa entre el medio definido optimizado y el medio TSB	126
ANEXO P. Análisis estadístico de la comparación del rendimiento de sustrato en biomasa entre el medio definido optimizado y el medio TSB	128
ANEXO Q. Análisis estadístico de la comparación UFC/mL entre el medio definido optimizado y el medio TSB	130
ANEXO R. Modelo matemático de la cinética de crecimiento en el medio definido optimizado	132
ANEXO S. Modelo matemático de la cinética de crecimiento en el medio TSB	133
ANEXO T. Modelo matemático del consumo de sustrato en el medio definido optimizado	134
ANEXO U. Modelo matemático del consumo de sustrato en el medio TSB	135
ANEXO V. Cotización de reactivos y medio semicomplejo	135

INTRODUCCIÓN

Los productos provenientes de la industria agrícola generan importantes ingresos para el país y el sostenimiento de millones de colombianos. Entre los principales productos agrícolas se encuentra el banano. Las exportaciones de banano en Colombia generan importantes divisas para el país después de las flores y el café, con valores de exportación que han oscilado entre US\$ 400 y US \$450 millones desde 1995 (Observatorio Agrocadenas Colombia, 2005).

La presión ejercida con la competencia de proveedores de banano económico y los cambios en las condiciones de los mercados externos, ponen en riesgo la industria bananera y el sostenimiento económico de muchas familias que dependen de la exportación del banano. La viabilidad futura de la Cadena dependerá del avance en la gestión productiva de las plantaciones, que mejoren los niveles de productividad y calidad de la fruta (Observatorio Agrocadenas Colombia, 2005). El aumento de la productividad a través de la aplicación de bioinsumos mejoraría la competitividad de la agroindustria bananera, manteniendo la estabilidad económica y social en la zona. Una de estas alternativas es el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria") que estimulen la asimilación de nutrientes del suelo, o que actúen como controladoras de patógenos entre otras funciones. Esta estrategia permitiría a los productores obtener mayores productividades con costos de fertilización menores y un mayor aprovechamiento de los fertilizantes.

Los inoculantes microbianos se han incorporado en las prácticas del campo por todo el mundo, con resultados satisfactorios, especialmente con el género

rhizobium (Scott y Bumgarner, 1965; Smith *et al.*, 1981; Somasegaran, 1985). Durante la década pasada se han abierto nuevos horizontes para esta industria con las investigaciones y los ensayos prácticos realizados con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (Bashan *et al.*, 1989; Bashan y Levanony, 1990; Kloepper *et al.*, 1989) y se han registrado en el mercado preparaciones comerciales de PGPR (Tang, 1994; Tang y Yang, 1997; Lucy *et al.*, 2004).

Entre los desafíos existentes para el desarrollo de la industria de las rizobacterias está el de mejorar los vehículos de las formulaciones. Estos vehículos deben proporcionar un ambiente que mantenga su viabilidad en el tiempo, que puedan ser usadas bajo condiciones de campo, que generen mayor protección contra el ambiente del suelo y una mejor rentabilidad. Adicionalmente, se deben optimizar los procesos de producción para la obtención de bioinsumo, estableciendo un método estándar para su producción y un medio de cultivo óptimo que permita obtener la cantidad de biomasa necesaria para su posterior aplicación en los cultivos.

Por todo lo anterior, surge la necesidad de desarrollar un medio de cultivo óptimo para la producción de la cepa *Pseudomonas putida* UA 44 aislada del suelo de la zona bananera con potencial para promover el crecimiento vegetal, el cuál posea buenos rendimientos de producción de células viables a un costo aceptable.

RESUMEN

En el presente trabajo se diseñó y optimizó un medio de cultivo químicamente definido para la bacteria *Pseudomonas putida* UA44 con potencial PGPR aislada del suelo de la zona bananera de Uraba por Ramirez (2004). Los resultados obtenidos en el medio químicamente definido (MD) se compararon con los hallados en un medio de cultivo semicomplejo (TSB: Tryptic Soy Broth por sus siglas en Ingles).

El diseño del medio de cultivo definido se efectuó según la composición elemental de las bacterias (Aiba *et al.*, 1973; Scragg, 1997) y la optimización se realizó con la técnica de Rosenbrock, la cual permitió obtener el medio óptimo en un número pequeño de pasos.

Los componentes optimizados en el medio de cultivo fueron la fuente de carbono (glucosa), la fuente de nitrógeno ((NH₄)₂SO₄) y la fuente de magnesio (MgSO₄-7H₂O) obteniendo en tres pasos consecutivos un medio de cultivo óptimo constituido por (g L⁻¹): glucosa, 5.0; (NH₄)₂SO₄, 5.662722; Na₂HPO₄, 0.27476; K₂HPO₄, 0.59003; CaCl₂-2H₂O, 0.20152; MgSO₄-7H₂O, 0.50716; CuSO₄-5H₂O, 3.93x10⁻³; y MnSO₄-4H₂O, 2.03x10⁻³. El (NH₄)₂SO₄ y MgSO₄-7H₂O aumentaron su concentración en el medio, mientras la glucosa disminuyó. Se obtuvo una concentración de biomasa de 1.71 g/L y 7.09x10⁹ UFC/mL. El rendimiento de consumo de sustrato fue de 0.33 g de biomasa/g de glucosa. Los resultados obtenidos con ambos medios de cultivo dieron diferencias significativas con relación a la cantidad de biomasa obtenida por peso seco (1.87 g/L TSB, 1.71 g/L MD) más no en unidades formadoras de colonia (7.35x10⁹ TSB, 7.09x10⁹ MD), debido posiblemente a una mayor presencia de células no viables en el medio TSB.

El mayor rendimiento en consumo de sustrato se observó en el TSB, el cual poseía diferentes fuentes de carbono (0.528 g/g TSB; 0.33015 g/g MD). Aunque este medio presentó un mayor beneficio en cuanto a resultados experimentales, mostró ser más costoso (89%) que el medio definido optimizado.

El modelo logístico es el que más se ajustó al crecimiento celular durante la fermentación. El coeficiente de mantenimiento fue mayor en el MD (8.20×10^{-2} g/(g*h) MD; 1.22×10^{-2} g/(g*h) TSB). Las velocidades máximas de crecimiento son similares para ambos medios (0.18 1/h MD; 0.19 1/h TSB)

Palabras claves: Diseño y optimización de medios de cultivo, *Pseudomonas putida* UA44, Método de Rosenbrock.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar y optimizar un medio de cultivo definido para la producción de biomasa de la cepa *Pseudomonas putida* UA 44 aislada del suelo de la zona bananera de Urabá y compararlo con un medio de cultivo semicomplejo a escala de laboratorio.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Diseñar un medio de cultivo basal para la cepa *Pseudomonas putida* UA 44 por medio de su composición elemental y de la concentración de biomasa requerida.
- Optimizar el medio de cultivo basal para la producción de biomasa de la cepa *Pseudomonas putida* UA 44 por medio del método de Rosenbrock.
- Evaluar la cinética de crecimiento y la cinética de consumo de sustrato de la cepa *Pseudomonas putida* UA 44 en el medio de cultivo definido optimizado y en un medio de cultivo semicomplejo, por medio de métodos gravimétricos y colorimétricos respectivamente, para comparar los rendimientos de ambos medios.

- Evaluar el costo - beneficio de ambos medios de cultivo, por medio de la determinación de rendimientos y por medio de una evaluación económica preliminar para determinar cual medio es más factible técnica y económicamente para su uso.

2. MARCO TEORICO

2.1 QUÉ SON LAS RIZOBACTERIAS?

La rizosfera es la zona de mayor actividad microbiológica alrededor de las raíces de las plantas (Curl y Truelove, 1986). El efecto de la rizosfera en general está, como la exudación radical, ligado a diversos factores que lo hacen bastante dinámico y complejo (Neumann y Römheld, 2001). Entre dichos factores pueden mencionarse: edad y estado de desarrollo de la planta, tratamiento y tipo de suelo, factores ambientales (luz, temperatura, humedad, pH), aplicaciones foliares de químicos, e interacciones microbianas (Curl y Treulove, 1986; Brimecombe *et al.*, 2001). Por lo tanto, la rizosfera es un ambiente creado por las interacciones entre los exudados radicales y microorganismos, de forma que estos últimos puedan utilizar los primeros como fuente de alimento o, en caso contrario, ser inhibido por ellos.

Las rizobacterias son bacterias que se encuentran naturalmente en las raíces de las plantas, donde gracias a los exudados y lisados radicales se crea un ambiente favorable para su desarrollo (Kloepper, 1993; Martínez y Kloepper, 2002). Son muy diversos los tipos de bacterias que pueden estar asociadas a raíces, de manera que las interacciones entre éstas y el vegetal pueden tener resultados neutros, positivos o negativos (Van Loon y Bakker, 2003).

Las bacterias que incrementan el crecimiento de la planta son conocidas como "Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal" (PGPR), por sus siglas en inglés "Plant growth-promoting rhizobacteria (Kloepper, 1994). En parte, este efecto positivo se debe a la inhibición de organismos patógenos de la planta por

supresión del hierro (Kloepper *et al.*, 1980), la utilización del complejo sideróforo-hierro por la planta (Powell *et al.*, 1980) y por la producción de diferentes sustancias o solubilización de nutrientes (Van Loon y Bakker, 2003).

Ramírez (2004) caracterizó 105 aislados de rizobacterias del género *musa* de la zona bananera de Uraba (Colombia), las cuales mostraron potencial como PGPR. 37% de los aislados pertenecen al género *Pseudomonas* fluorescentes. Entre estos aislados se encuentra la cepa mutante *Pseudomonas putida* UA44 con potencial para producir ACC-deaminasa.

2.2 *Pseudomonas putida*

Las *Pseudomonas putida* pertenecen al género *Pseudomonas*, familia de las *Pseudomonadacea*. Su movilidad está dada por uno o varios flagelos. Son aeróbicas y por ende usan el oxígeno para su metabolismo; en algunos casos el nitrato es usado, permitiendo que el crecimiento ocurra de manera anaeróbica. No pueden crecer bajo condiciones ácidas (pH 4.5 o menor). Las cepas de las *Pseudomonas* son de forma ovalada, poseen pared y membrana celular propias de las bacterias Gramnegativas. La membrana citoplasmática separa el citoplasma bacterial de los otros componentes que cubren la célula. Su eficacia como barrera está relacionada con la composición de la bicapa lipídica, la cual puede experimentar cambios relativamente rápidos para ajustar su fluidez a los cambios en la composición del medio y las condiciones físicas del entorno. La membrana está compuesta de un lípido especial (lipopolysacárido, LPS) con cadenas de hidrocarburos (Palleroni, 2005).

Algunas especies de *Pseudomonas* son patógenas para los humanos, animales o plantas, entre las cuales se encuentra la *P. aeruginosa*, que puede originar

infecciones seria y fatales en pacientes debilitados cronologicamente (Palleroni, 2005). Algunas, como las *Pseudomonas fluorescens*, poseen efectos benéficos en las plantas. Entre sus efectos se haya el de ser estimuladoras de crecimiento. Se ha encontrado que las *Pseudomonas* son capaces de acumular polyhidroxialcanoatos (PHAs). Estos polímeros (PHAs) son cuerpos de inclusión acumulados por bacterias cuando el medio de cultivo se encuentra desequilibrado. Dicho material es acumulado como fuente de carbono y energía para ser utilizado posteriormente. El interés hacia estos polímeros ha ido en aumento debido a sus aplicaciones en medicina, agricultura y otras áreas (Suárez y Suárez, 1997).

Las cepas del género *Pseudomonas* pueden crecer en un medio mínimo, químicamente definido con iones de amonio o nitrato como fuente de nitrógeno y un solo compuesto como única fuente de carbono y energía. La mejor temperatura para el crecimiento de la mayoría de las cepas es aproximadamente 28-30°C. Algunas especies crecen a una velocidad sustancial en 4°C y pueden ser consideradas psicotrópicas. Para otras, la máxima temperatura es de 45°C, por lo tanto no pueden ser termófilas Ningún género (o especie) tolera condiciones ácidas y no crecen en pH 4.5 (Palleroni, 2005).

Los medios de cultivo usados para el crecimiento de *Pseudomonas* requieren una única fuente de carbono y energía combinada con minerales. Se ha encontrado la siguiente base mineral en los medios de cultivo (Tabla 1) y composición elemental de las bacterias (Tabla 2). En general, los compuestos esenciales encontrados para el cultivo de las *Pseudomonas* son el cobre, el magnesio y una fuente de amonio (Mateles y Battat, 1974).

Tabla 1. Constituyentes inorgánicos de las bacterias (Aiba *et al.*, 1973)

Componente	g/100 g de peso seco
Fósforo	2.0 – 3.0
Azufre	0.2 – 1.0
Potasio	1.0 – 4.5
Magnesio	0.1 – 0.5
Sodio	0.5 – 1.0
Calcio	0.01 – 1.1
Hierro	0.02 – 0.2
Cobre	0.01 – 0.02
Manganeso	0.001 – 0.01
Ceniza Total	7 – 12

Tabla 2. Composición elemental de las bacterias (Scragg, 1997)

Componente	% de peso seco
Carbono	53.0
Nitrógeno	12.0
Fósforo	3.0
Azufre	1.0
Oxígeno	20.0
Magnesio	0.5
Hidrogeno	7.0
Ceniza total*	7.0

*La ceniza contiene: Na, Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, K, Co.

2.3 DESARROLLO DE MEDIOS DE CULTIVO

La tabla 3 muestra las etapas esenciales que se deben tener en cuenta para el desarrollo de un medio de cultivo deseado.

Tabla 3. Etapas y tópicos relacionados para el desarrollo del medio de cultivo. (Ertola *et al.*, 1995)

ETAPA	CARACTERISTICAS
Diseño	<ul style="list-style-type: none">• Requerimientos nutricionales para el crecimiento y formación del producto• Presencia de otros aditivos• Mecanismos bioquímicos• Procesos “Upstream” y “Downstream”• Iones biodisponibles• Costo, disponibilidad, y conveniencia de Sustratos
Formulación	<ul style="list-style-type: none">• Composición másica de las células, estequiometría de crecimiento y formación de producto• Coeficientes de rendimiento y otros parámetros de fermentación.
Optimización	<ul style="list-style-type: none">• Metodologías de optimización

Una manera rápida para desarrollar el medio de cultivo deseado es seleccionar un medio de la literatura y optimizarlo según las necesidades presentes. Los aspectos más importantes a tener en cuenta para el diseño del medio de cultivo son: el

medio debe cumplir las exigencias nutricionales del microorganismo, y el costo y disponibilidad de los sustratos debe ser adecuado (Ertola *et al.*, 1995).

2.3.1 Diseño de medios de cultivo

El diseño del medio de cultivo es la primera etapa en el desarrollo del medio, el cual finaliza con la selección de los nutrientes (Ertola *et al.*, 1995). Este medio considera la funcionalidad de los nutrientes para promover el crecimiento y tiene en cuenta toda la información disponible acerca del microorganismo, sustratos, y sus procesos metabólicos. Se deben seleccionar los nutrientes de acuerdo a las necesidades nutricionales del microorganismo para su crecimiento y conocer las diferentes rutas metabólicas y su regulación (Ertola *et al.*, 1995).

Se deben de conocer los procesos *upstream* y *downstream* durante el diseño. El proceso *upstream* se relaciona con el pretratamiento del sustrato, por ejemplo los efectos de la esterilización en la composición del medio (Ertola *et al.* 1995). En la relación con los procesos *downstream* es importante considerar la influencia de los componentes del medio (o compuestos que se han producido) en las etapas de separación y purificación (Ertola *et al.*, 1995).

El costo y la disponibilidad de una fuente regular son aspectos esenciales que afectan la sostenibilidad de cualquier sustrato usado en la preparación del medio. Es importante también tener en cuenta la estabilidad del material (Ertola *et al.* 1995).

El diseño de un medio de cultivo posee una importancia crítica debido a que la composición del medio puede afectar significativamente el rendimiento y la productividad del microorganismo. La composición del medio también puede afectar la facilidad y el costo de la separación del producto en el proceso

downstream (Kennedy y Crouse, 1999). En el diseño de un medio de cultivo óptimo, se ven implicados una gran mayoría de experimentos. Este número elevado de experimentos hace que sea necesaria la utilización de agitadores orbitales, debido a que no es práctico realizar esta gran cantidad de ensayos en bioreactores (Kennedy y Crouse, 1999).

2.3.2 Formulación

La formulación se relaciona con el cálculo de las concentraciones de los componentes nutricionales del medio de cultivo (Ertola *et al.*, 1995).

Para calcular la concentración de cada componente en un medio definido se usa la composición de la célula, y los rendimientos de crecimiento celular. Es una simple estrategia de balance de masa. Esto se hace a un nivel elemental, por ejemplo, balanceando las cantidades de carbón o nitrógeno (Kennedy y Crouse, 1999). Se puede identificar, por medio de esta técnica, el nutriente limitante y cambiarlo si es lo deseado. Utilizar datos de rendimiento también permite predecir una concentración celular teórica máxima (Kennedy y Crouse, 1999).

2.3.3 Optimización

En la optimización se observan y modifican (si es necesario) la naturaleza y concentración de los nutrientes (Ertola *et al.*, 1995). Para mejorar un medio de cultivo usando el diseño experimental, se requiere de ambos, un diseño experimental y una técnica de optimización. El diseño especifica las variables del medio de cultivo que se van a ensayar en el experimento, incluyendo el número de réplicas y el arreglo de las pruebas en “bloques” homogéneos. Entonces, usando los datos experimentales, la técnica de la optimización emplea un modelo

matemático para predecir una composición del medio de cultivo mejorada (Kennedy y Crouse, 1999).

Dentro de las dificultades que se pueden presentar en el proceso de optimización se encuentra (Kennedy y Crouse, 1999): tiempo de desarrollo, costo del desarrollo del medio de cultivo, falta de espacio en el agitador orbital, reacciones de precipitación, calidad del agua e interferencia de los componentes en las técnicas de análisis.

Existen varias metodologías que pueden ser usadas para optimizar el medio. Las más adecuadas están basadas en el uso de cultivos continuos y en técnicas estadísticas.

Los diseños de experimentos estadísticos consideran todas las posibles combinaciones de los factores que han de ser estudiados en los niveles decididos por el experimentador. El diseño factorial completo es usado solamente para un pequeño número de componentes (n) y niveles (k) debido a que el número de experimentos resultantes es de k^n . Se usan normalmente dos metodologías en los diseños estadísticos, el diseño factorial fraccional (o incompleto) y los métodos heurísticos (Ertola *et al.*, 1995).

Las tablas usadas en el diseño factorial son las de Plackett y Burman (1946) para dos niveles y las de Box y Wilson (1951) para tres niveles. Ambos son diseños factoriales fraccionados. Los métodos heurísticos son basados en la técnica simplex; la respuesta óptima es obtenida moviendo el simplex (un algoritmo análogo de una figura geométrica definida por los puntos del experimento) en dirección de la respuesta optimizada (Morgan y Deming, 1974).

La superficie de respuesta es probablemente la herramienta estadística más usada para optimizar los componentes de un medio de cultivo. La superficie de respuesta puede ser usada para determinar las condiciones óptimas, el rango de las variables a controlar, y generar ecuaciones polinómicas. También puede ser usada para estimar las relaciones entre las variables controladas y los resultados observados (Kim *et al.*, 2007).

En la tabla 4 se muestran las técnicas de optimización de medios de cultivo más utilizadas hoy en día.

Tabla 4. Técnicas de optimización de medios de cultivo. (Kennedy y Krouse, 1999)

Técnica de optimización	Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> Superficie de Respuesta 	<ul style="list-style-type: none"> Visualiza los resultados en 3D. 	<ul style="list-style-type: none"> El gráfico es limitado para dos variables al tiempo.
<ul style="list-style-type: none"> Plackett y Burman 	<ul style="list-style-type: none"> Sirve como cribado. Muestra cuales variables influyen en el resultado final 	<ul style="list-style-type: none"> No permite saber las interacciones entre variables.
<ul style="list-style-type: none"> Rosenbrock Modificado 	<ul style="list-style-type: none"> Se puede llegar al punto óptimo en pocos pasos 	<ul style="list-style-type: none"> No es un método eficiente.
<ul style="list-style-type: none"> Simplex Nelder- 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere pocos experimentos 	<ul style="list-style-type: none"> No puede ser utilizado en la determinación de variables

Mead	<ul style="list-style-type: none"> • Fermentación continua y batch por pulsos • Análisis estequiométrico 	<ul style="list-style-type: none"> • Se identifica de manera exacta el nutriente limitante de crecimiento. • Considera qué está pasando dentro de la célula. 	<p>cualitativas</p> <ul style="list-style-type: none"> • No es aconsejable cuando las condiciones experimentales son de difícil control. • Solo es posible optimizar un factor a la vez. • Interacciones y reacciones de precipitación pueden ocurrir si un gran número de componentes son añadidos en el sistema batch. • Se incrementa el riesgo de contaminación del cultivo continuo debido al gran número de cambios del sistema. • Ocurre una considerable simplificación.
------	--	--	---

Una manera rápida de obtener el medio de cultivo óptimo para el microorganismo es emplear el método propuesto por Rosenbrock (1960). Es un método más estable que otros métodos de cambios de composición, que permite un menor número de ensayos y un diseño poco complicado. El método Rosenbrock se basa en un algoritmo de búsqueda de base 0 (lo que significa que no requiere ninguna derivada de la función objetivo, solo se usa la evaluación de la función objetivo). El método se aproxima a una búsqueda de gradiente (Rosenbrock, 1960).

2.4 ANTECEDENTES

La optimización del medio definido (MD) consiste en determinar los nutrientes apropiados y establecer las concentraciones que permitirán un mejor crecimiento celular. Tradicionalmente, la optimización del medio definido es realizada en agitadores orbitales. Un cambio en la concentración o naturaleza de los componentes genera un cambio en la velocidad de crecimiento, en densidad celular y/o rendimiento del producto obtenido (Zhang y Greasham, 1999). Usando la técnica de una sola omisión Cocaign-Bousquet *et al.* (1995) determinaron los rendimientos nutricionales y simplificaron enormemente su medio sintético para el crecimiento de *L. lactis*. Sin embargo, estos métodos aunque simples, requieren de tiempo y trabajo, pero los resultados pueden ser satisfactorios. Elvira *et al.* (2004) usaron la técnica de una sola omisión para optimizar los requerimientos nutricionales del *L. delbrueckii* subsp. *Lactis*. Ellos aplicaron la técnica a cada componente del medio de cultivo definido para determinar los requerimientos nutricionales, el cual permitía el crecimiento sostenible del *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Se obtuvieron tasas específicas de crecimiento entre 0.32 h^{-1} y 0.30 h^{-1} . Este medio de cultivo definido es simple y puede ser usado en vez de los medios complejos para estudios bioquímicos, fisiológicos y genéticos.

En métodos de optimización de cultivo para *Pseudomonas putida*, se encuentra el uso por Hofer *et al.* (2002). Ellos optimizaron el medio de cultivo en dos etapas. En la primera etapa obtuvieron la concentración óptima de glucosa. En este paso se definió la función objetivo como la concentración de glucosa, la cual contenía los parámetros principales de este experimento: biomasa producida y los coeficientes de rendimiento para la glucosa, el extracto de levadura y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La concentración del extracto de levadura y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se incrementaron linealmente con la concentración de glucosa. La concentración de glucosa se incrementó en 5 etapas de 11 g L^{-1} a 60 g L^{-1} , obteniendo una

concentración de glucosa óptima de 40 g L⁻¹. En un segundo paso utilizaron un diseño compuesto central para optimizar las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo, maximizando la función objetivo. El medio optimizado produjo siete veces más biomasa que el medio de cultivo inicial.

Sánchez *et al.* (2003) optimizaron un medio de cultivo de sirope-fructosa a nivel de laboratorio. La *Burkholderia cepacia* llegó a la fase estacionaria a las 10 horas de incubación, obteniendo una velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial de 0.27h⁻¹. La estrategia de optimización del medio se basó en el diseño experimental de dos niveles, que se utilizó para el ~~amizado~~ muestreo de las variables, el cual indicó la dirección hacia donde mejoraron los rendimientos de la producción de sideróforos. La optimización del medio de cultivo mostró los mejores resultados en cuanto a la producción del metabolito secundario con cantidades de sirope-fructosa de 13.4 mL y de peptona de 10 g.

Nair y Panda (1997) usaron técnicas estadística para optimizar las fuentes de carbón y nitrógeno presentes en el medio de cultivo para la síntesis de pectinasas usando *Aspergillus niger*. El medio optimizado produjo 40% más pectinasa que el medio inicial.

El uso de Rosenbrock modificado ha sido reportado por Votruba *et al.* (1975), y Rodriguez *et al.* (1983), los cuales usaron experimentalmente el método Rosenbrock de búsqueda directa para optimizar su medio de cultivo. En un ciclo de optimización, la búsqueda para mejorar la media de la variable ocurre a lo largo de las direcciones n , las cuales están en ángulos rectos a cada lado. Una vez que la variable ha sido optimizada, las direcciones de búsqueda son actualizadas y un nuevo ciclo comienza. Votruba *et al.* (1975), mostró que el método de Rosenbrock puede determinar medios optimizados en pocos pasos (Kennedy y Krouse, 1999). Votruba *et al.* (1975) encontró que el método de Rosenbrock es menos tedioso de

realizar comparado con el método Box-Wilson para la optimización del medio de cultivo, especialmente para optimizar grandes números de parámetros. El método de Rosenbrock es más estable durante la optimización que los métodos de gradiente, los cuales son muy sensibles a la selección de las etapas en la dirección del gradiente y pueden salirse de la región óptima (Votruba *et al.*, 1975).

En el instituto Finlay de Cuba, el Dr. Riveron y su grupo de colaboradores hace uso de este método con mucha frecuencia para la optimización de los medios de cultivo utilizados para la producción de vacunas a partir de microorganismos recombinantes. El medio de cultivo que fue desarrollado por el grupo de trabajo del Dr. Riveron para la cepa F-9 garantizó altos niveles de expresión para el polisacárido VI con un máximo a las 1.6 horas de fermentación. La velocidad específica máxima de crecimiento en el medio optimizado fue de 1.3868 h^{-1} (Riverón, 2006).

3. MATERIALES Y EQUIPOS

3.1 MATERIALES

Los materiales utilizados para la realización del proyecto se muestran en la siguiente lista:

- Agua destilada
- Agua destilada estéril
- Agar CASO marca MERCK
- Caldo CASO marca MERCK
- Cajas petri.
- Cloruro de calcio dihidratado marca C.ERBA
- Criobanks marca COPAN
- Eppendorfs
- Filtros de membrana de ester de celulosa de 0.2 μm marca Advantec.
- Fosfato dipotásico marca C.ERBA
- Fosfato de sodio hidratado marca C.ERBA
- Glucosa anhídrica marca MERCK
- Solución DNS
- Solución BUFFER fosfato 0,1 M pH=7.4
- Solución de sulfato de magnesio 0.1 M.
- Solución stock de rifampicina 100 ppm.
- Sulfato de amonio marca C.ERBA
- Sulfato de cobre pentahidratado marca MERCK
- Sulfato de magnesio heptahidratado marca C.ERBA
- Sulfato de manganeso tetrahidratado marca C.ERBA
- TSB (Caldo Soya Tripticasa) marca MERCK

3.2 EQUIPOS

En la siguiente lista se enuncian los equipos usados durante el desarrollo del proyecto:

- Agitador magnético con calentamiento marca Barnsted/ThermoLyne corporation.
- Asa bacteriológica.
- Autoclave de horizontal marca Trident Medical Corporation modelo 620
- Balanza Adventurer™ OHAUS con precisión de 0.01 g.
- Bomba de vacío de diafragma marca Vacuubrand
- Cámara de flujo laminar vertical C4 marca Control y Contaminación modelo 100V
- Centrífuga universal marca HETTICH
- Espectrofotómetro marca Cole Palmer, Helios Gamma.
- Horno de convección forzada marca JEIO TECH OF-02
- Incubadora marca WTBinder
- Micropipetas
- Material volumétrico: erlenmeyers de 100 mL y 1000 mL, beakers de 50 ml, 100 mL, 500 mL y 1000 mL, probetas de 100 mL y 250 mL.
- pH-metro marca METRHOM.
- Agitador orbital marca New Brunswick Science de 1 plg de orbita.
- Tubos de ensayo.
- Tubos taparrosca de 15 mL.
- Vortex marca DAIGGER Genie 2'

4. METODOLOGÍA

4.1 UBICACIÓN:

Los ensayos y análisis correspondientes a este proyecto fueron realizados en el laboratorio de biotecnología de la Universidad EAFIT en la ciudad de Medellín.

4.2 MICROORGANISMO

La cepa *Pseudomonas putida* UA 44 aislada del suelo bananero de la zona de Urabá y resistente a rifampicina fue facilitada por el banco de biotecnología de la Universidad de Antioquia y conservada en TSB + 20% glicerol a 4°C en el laboratorio de biotecnología de la Universidad EAFIT. La bacteria fue repicada adicionando 100 uL en TSA 50% con 200 ppm de rifampicina, incubada a 30°C por 24 h y posteriormente la biomasa fue conservada en criobanks a -4°C para su posterior uso como cepa de trabajo.

4.3 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se usaron dos medios de cultivo para su evaluación (medio definido y medio semicomplejo).

4.3.1 Medio definido (MD)

Se realizó el diseño y la formulación del medio de cultivo definiendo según las siguientes etapas:

- Determinación de la concentración celular deseada al final del cultivo.
- Composición elemental de la bacteria (Tabla 1 y 2).
- Determinación de las fuentes de cada elemento utilizadas como nutrientes según la ecuación 1. Estos nutrientes fueron elegidos según la disponibilidad y costo de las materias primas y según la necesidad de los factores de crecimiento.
- Estimación del rendimiento de sustrato en biomasa (Y_{xs}). Se determinó según pruebas preliminares y referencias bibliográficas.

Con base en la revisión bibliográfica (Scragg, 1997; Aiba *et al.*, 1973) y por medio de cálculos matemáticos (ecuación 1), se formuló el MD basal (Tabla 7).

$$N = \frac{E * X * M_{wN}}{A * M_{wE}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

N: Nutriente requerido (g/L)

E: Gramos del elemento presentes en la célula (g elemento/ g célula)

X: Concentración celular requerida (g/L)

M_{wN} : Peso molecular del nutriente (g/mol)

A: Número de átomos del elemento presentes en el nutriente

M_{wE} : Peso molecular del elemento (g/mol)

Se tomó como rendimiento de sustrato en biomasa (Y_{xs}) un valor de 0.5 g de biomasa/g de glucosa (Doran, 1999), tomando como única fuente de carbono la glucosa bajo condiciones aeróbicas. La concentración final de biomasa se estimó en 3 g/L con base en ensayos preliminares realizados por el semillero de investigación en diseño de productos químicos y biotecnológicos (BIOQUIP) de la

Universidad EAFIT, quienes obtuvieron la cinética de crecimiento de la *Pseudomonas putida* UA44 usando como medio de cultivo TSB.

Para la determinación de la concentración de glucosa el valor arrojado por la ecuación 1 se dividió por el rendimiento de sustrato en biomasa para lograr suplir las necesidades de mantenimiento celular.

La esterilización del MD se realizó por vapor y filtración. La fuente de nitrógeno y las sales minerales fueron esterilizadas en autoclave a 121°C y 15 psi por 15 min. La glucosa fue esterilizada por filtración usando filtros de éster de celulosa de 0.2 µm. Todos los componentes del MD fueron mezclados por último en la cámara de flujo laminar previamente desinfectada.

4.2.2 Medio Semicomplejo

El medio semicomplejo escogido fue TSB, el cual ha sido utilizado por Ramírez (2004) con buenos resultados para el cultivo de la *Pseudomonas putida* UA44 (Tabla 6).

Tabla 5. Composición del TSB (MERCK)

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
Peptona de caseína	17.0
Peptona de soya	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Dextrosa	2.5
Fosfato dipotásico	2.5
pH	7.3 ± 0.2

La esterilización del TSB se realizó en autoclave a 121°C y 15 psi por 15 min.

4.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.4.1 Curva de calibración

La fermentación de la curva de calibración se realizó en 150 mL de medio de cultivo TSB en erlenmeyer con 15 mL de preinóculo (10% del volumen total). La *P. putida* UA 44 almacenada en criobanks a 4°C fue sembrada en TSA 50% (Agar Tripticasa de Soya) con rifampicina a 200 ppm por 24 h. Posteriormente se tomó una asada de bacterias y fue inoculada en 15 mL de medio paa hacer el preinóculo. El preinóculo fue puesto en agitación constante a 150 r.p.m en oscuridad por 24 h. A continuación el preinóculo se adicionó a 135 mL de medio de cultivo. La fermentación se realizó con agitación constante a 150 r.p.m en oscuridad, a una temperatura de 28 ± 2 °C y sin control de pH, durante 24 h. El TSB fue esterilizado en autoclave a 121°C y 15 psi por 15 min.

Para realizar la curva de calibración de densidad óptica vs peso seco, se tomaron varias muestras en la fase estacionaria de la fermentación para realizar diferentes diluciones (Tabla 6).

Tabla 6. Diluciones de la curva de calibración de concentración de biomasa

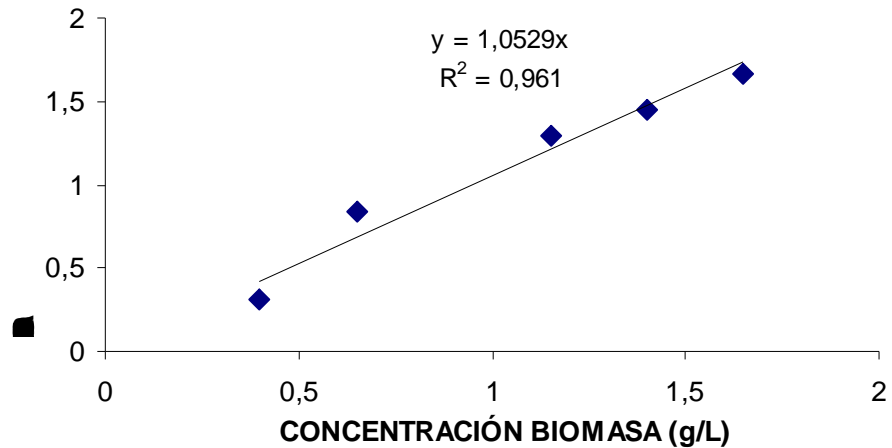
DILUCIÓN	Fermentación	H₂O destilada estéril
	mL	mL
0	10	0
1	8	2
2	6	4
3	4	6
4	2	8

A cada dilución se le determinó densidad óptica y peso seco de la siguiente manera:

La determinación de biomasa por peso seco, se realizó tomando muestras por duplicado de 1 mL de cada dilución en un tubo eppendorf previamente secado a 50°C por 24 h y pesado. La biomasa se centrifugó a 14000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C y el sobrenadante fue descartado. Los tubos eppendorf se llevaron al horno a 50°C hasta lograr peso constante (Shuler y Kargi, 1992). Para la medición de densidad óptica se tomaron muestras por duplicado de 1 mL de cada dilución en tubos eppendorfs, los cuales fueron centrifugados a 14000 r.p.m y 4°C por 20 min. La biomasa fue resuspendida en sulfato de magnesio y su absorbancia fue leída a 600nm. Se usó como blanco sulfato de magnesio (Ramírez, 2004)

Una vez obtenidos todos los puntos se correlacionó la densidad óptica con el peso seco (gráfica 1)

Gráfica 1. Curva de calibración de biomasa con respecto a la absorbancia



4.4.2 Medición de biomasa por densidad óptica

La determinación de biomasa por peso seco, determina la cantidad de gramos de biomasa por litro que se obtienen al final de la fermentación sin diferenciar células viables de no viables.

Para realizar la medición de densidad óptica, se tomaron muestras de 1 mL de los erlenmeyers y se adicionaron a tubos eppendorfs, se centrifugaron a 14000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue almacenado y las células fueron resuspendidas en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mM. La absorbancia fue leída a 600 nm utilizando como blanco $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mM sin células (Ramírez, 2004).

4.4.3 Medición de UFC/mL

El conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) determina el número de colonias de bacterias viables que se obtienen en la fermentación.

Para el conteo de UFC, se tomaron muestras de 1 mL del erlenmeyer en la fase estacionaria, en condiciones de asepsia, en un tubo de ensayo previamente

esterilizado. Se realizaron diluciones seriadas desde 1/10 hasta 1/10.000.000 para realizar el método de dilución en placa. En la dilución de 1/1.000.000 se sembraron 50 µL en cajas petri . Para la dilución de 1/10.000.00 se agregaron 100 µL en cada caja. La biomasa fue esparcida de manera circular sobre la superficie del agar usando una espátula de Drigalski y rotando la caja petri. Cada ensayo se realizó por triplicado en cajas petri con TSA al 50%. Las cajas petri son incubadas a 28°C por 24h aproximadamente e invertidas para evitar que el vapor de agua condensado cayera sobre la superficie del medio. Posteriormente se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias en aquellas diluciones en donde existieran entre 30 y 300 UFC por caja (Shuler y Kargi, 1992) y se realizó el calculo de UFC/mL según la ecuación 2:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{C * D}{V} \quad \text{Ecuación 2}$$

C: número de colonias en toda la caja petri (UFC).

D: factor de dilución

V: volumen sembrado (mL)

4.4.4 Determinación de azúcares reductores

El método del ácido dinitrosalisílico (DNS) permitió estimar la cinética de consumo de sustrato. Este método se basa en la reducción del ácido 3-5-dinitrosalisílico (DNS) por azúcares reductores como la glucosa o galactosa, para formar un compuesto nitro-aminado de color amarillo. La absorbancia a 540 nm es proporcional a la concentración de azúcares reductores (Miller, 1959).

Para la determinación de azúcares reductores se siguió la técnica del DNS para el medio MD (ANEXO A) y en el caso del TSB se realizó el método del DNS para sacarosa (ANEXO B).

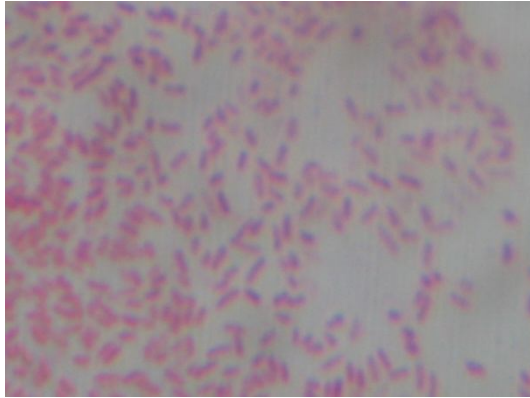
4.5 FERMENTACIONES SUMERGIDAS CON *P. putida* UA 44

Las fermentaciones se hicieron por duplicado en erlenmeyers de 1 L con 250 mL de medio de cultivo e inoculadas con 25 mL de preinoculo (10% del volumen total). La *P. putida* UA 44 almacenada en criobanks a 4°C fue sembrada en TSA 50% (Agar Tripticasa de Soya) con rifampicina a 200 ppm por 24 h. Posteriormente se tomó una asada de bacterias y fue inoculada en 50 mL de medio para hacer el preinóculo. El preinóculo fue puesto en agitación constante a 150 r.p.m en oscuridad por 24 h. A continuación se adicionaron 25 mL de preinóculo a cada erlenmeyer de 1 L con 225 mL de medio de cultivo. Esto se realizó para asegurar una concentración inicial de biomasa igual en cada uno de los ensayos. Los ensayos fueron realizados con agitación constante a 150 r.p.m en oscuridad, a una temperatura constante de 28 ± 2 °C y sin control de pH durante la fermentación (pH inicial 7.2). Las fermentaciones se llevan a cabo hasta terminar la fase exponencial.

La toma de muestras durante la cinética se realizó cada 2 horas y se hizo por duplicado. Se tomó 1 mL de muestra de cada erlenmeyer con una punta estéril y se adicionó en tubos eppendorf. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 14000 r.p.m y a 4°C por 20 min. El sobrenadante fue almacenado en el congelador a 4°C y las células fueron resuspendidas en sulfato de magnesio 0.1 M para determinar la absorbancia a 600 nm. Al sobrenadante se le realizó DNS para cuantificar el consumo de sustrato.

Al final de la medición de la cinética celular se realizó en cada una de las etapas de optimización del MD y en el TSB el método de Tinción de Gram (Figura 1), metodología descrita en el Anexo C. Este procedimiento se realizó para asegurar que el procedimiento no fue contaminado durante el ensayo.

Figura 1. Tinción de Gram de la *Pseudomonas putida* UA44



4.6 OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DEFINIDO

La optimización se realizó mediante el método de Rosenbrock donde el tamaño de paso se determinó según bibliografía y experiencia. El tamaño de paso determina en qué cantidad se aumenta o disminuye la concentración del componente a optimizar en la siguiente fermentación. Cada aumento de paso se realizó uno a la vez y se observó su efecto positivo o negativo en la producción de biomasa, UFC/mL, y Y'_{XS} .

4.7 PARÁMETROS CINÉTICOS

4.7.1 Rendimiento observado de sustrato en biomasa (Y'_{XS})

El rendimiento observado de sustrato en biomasa (Y'_{XS}) indica la cantidad de fuente de carbono consumida que es transformada en biomasa. Este sustrato incluye tanto aquella cantidad que se requiere para formar biomasa, para

mantenimiento celular y para formación de producto (Doran, 1996). El rendimiento fue determinado según la ecuación 3.

$$Y'_{XS} = \frac{r_x}{r_s} = \frac{dx/dt}{-ds/dt} = \frac{\Delta x}{-\Delta s} \quad \text{Ecuación 3 (Doran, 1996)}$$

Donde:

Y'xs:	rendimiento observado de sustrato en biomasa (g/g)
r _x	velocidad de crecimiento de biomasa (g/L.h)
r _s :	velocidad de consumo de sustrato (g/L.h)
x:	concentración de biomasa (g/L)
s:	concentración de sustrato (g/L).

De esta manera, el rendimiento fue determinado con la pendiente de la gráfica X vs S (Doran, 1996).

4.7.2 Velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max})

En un sistema cerrado donde el crecimiento es el único proceso que afecta la concentración celular, siendo μ constante entonces, la velocidad de crecimiento celular puede ser descrita por la ecuación 4 (Doran, 1996)

$$x = x_0 e^{\mu_{\max} t} \quad \text{Ecuación 4 (Doran, 1996)}$$

Donde:

x:	concentración de celular (g/L)
x ₀ :	concentración celular al inicio de la fase exponencial (g/L)
μ_{\max} :	velocidad específica máxima de crecimiento

La ecuación 4 fue linealizada aplicando logaritmos naturales a ambos lados (ecuación 5) y la pendiente de la gráfica $\ln x$ vs t representó la velocidad específica máxima de crecimiento (Doran, 1996).

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_{\max} t \quad \text{Ecuación 5}$$

4.8 DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño de experimentos es anidado donde, los factores son los componentes del medio de cultivo. Estos factores se determinaron según la revisión bibliográfica y se evaluaron tres componentes (glucosa, sulfato de amonio y sulfato de magnesio). Mateles y Battat (1974) concluyeron que el sulfato de cobre, el sulfato de magnesio y el sulfato de amonio son compuestos limitantes en el crecimiento de *Pseudomonas*. Los niveles de cada factor son definidos según los resultados de la optimización de cada paso del método de Rosenbrock.

Para el análisis estadístico se empleó el programa STATGRAPHICS Plus 5.1. Se realizó un análisis de varianza de un factor. El intervalo de confianza establecido fue de 95%, tomando como significativos aquellos factores que tienen un valor $P > F$ menor de 0.05. Las variables respuesta fueron concentración de biomasa, Y'_{xs} , UFC/mL y μ_{\max} .

4.9 MODELO MATEMÁTICO

Los modelos matemáticos más extensamente usados para describir el crecimiento celular son el modelo cinético de Monod, el modelo logístico y el modelo Haldane

(Gong y Lun, 1996). La cinética de crecimiento de la bacteria *Pseudomona putida* UA44 fue ajustada al modelo matemático logístico. La ecuación logística puede describir la inhibición de la biomasa en el crecimiento del microorganismo, lo cual existe en muchas fermentaciones tipo batch. El modelo logístico puede ser representado matemáticamente según la ecuación 6.

$$X = \frac{X_o X_m e^{\mu_{\max} t}}{X_m - X_o + e^{\mu_{\max} t}} \quad \text{Ecuación 6 (Liu et al., 2003)}$$

Donde:

X: concentración celular (g/L)

X_m: concentración máxima celular (g/L)

X_o: concentración inicial celular (g/L)

μ_{max}: velocidad máxima específica de crecimiento (1/h)

t: tiempo de fermentación (h).

Para modelar matemáticamente el consumo de sustrato (ecuación 7) por parte de la *Pseudomona putida* UA44, se asumió que toda la fuente de carbono fue usada para el crecimiento celular y mantenimiento de las células, y que la cantidad de sustrato usada para la formación de productos era despreciable.

Ecuación 7 (Benkortbi et al., 2007)

$$S = S_o - yX_o \left(\frac{e^{\mu_{\max} t}}{(1 - (X_o / X_m) - (1 - + e^{\mu_{\max} t}))} - 1 \right) - m_s \frac{X_m}{\mu_{\max}} \ln \left(1 - \frac{X_o}{X_m} (1 - e^{\mu_{\max} t}) \right)$$

Donde:

S: concentración de sustrato (g/L)

S_0 : concentración de sustrato inicial (g/L)

X_m : concentración máxima celular (g/L)

X_0 : concentración inicial celular (g/L)

μ_{max} : velocidad específica máxima de crecimiento (1/h)

t: tiempo de fermentación (h)

Y_{xs} rendimiento teórico de células por sustrato consumido (g de células/g de sustrato)

m_s : coeficiente de mantenimiento (g sustrato/(g biomasa*horas)).

Los datos fueron introducidos en el programa Polymath 5.1. El programa resuelve cada una de las ecuaciones usando el algoritmo Levenberg-Marquardt (L-M) para encontrar el valor de los parámetros. La técnica L-M es un método iterativo que converge rápidamente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Diseño y formulación del medio de cultivo basal

En base a la composición elemental de las bacterias (Tabla 1 y 2) y la ecuación 1 se formuló el medio definido (MD) basal inicial (Tabla 7).

Tabla 7. Medio de cultivo definido basal

ELEMENTO	NUTRIENTE	
	Fórmula molecular	Concentración (g/L)
C	C ₆ H ₁₂ O ₆	16,56
N	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,83
P	Na ₂ HPO ₄	0,27
P	K ₂ HPO ₄	0,59
Ca	CaCl ₂ -2H ₂ O	0,20
Mg	MgSO ₄ -7H ₂ O	0,25
Cu	CuSO ₄ -5H ₂ O	3.93x10 ⁻³
Mn	MnSO ₄ -4H ₂ O	2.03x10 ⁻³
Na	Na ₂ HPO ₂	-
pH		7.2 ± 0.01

Los macroelementos constituyen el 90 al 95% de la biomasa seca de los microorganismos. Estos macroelementos son esencialmente C, N, O, H, S, P, K, y Mg para los cuales se escogieron diferentes nutrientes fácilmente asimilables por el microorganismo.

La fuente de carbono se escogió como la glucosa por ser altamente asimilable por todos los microorganismos ya que entra directamente a la glucólisis, donde es oxidada, produciendo piruvato y energía para la célula. La energía producida es usada para construir los componentes de la célula como son las proteínas y los ácidos nucleicos. Esta fuente de carbono es esencial para proveer de carbono a la célula, de energía y para funciones de mantenimiento como el transporte de materiales, trabajo osmótico y movimiento celular (Martinko *et al.*, 1998).

La fuente de nitrógeno fue el sulfato de amonio, el cual es fácilmente asimilado por el microorganismo, puede conseguirse en el mercado y es la fuente más usada en el laboratorio y en la industria (Ertola *et al.*, 1995). El nitrógeno hace parte fundamental de las proteínas, de los ácidos nucleicos y de los polímeros de la pared celular (Ertola *et al.*, 1995)

La fuente de oxígeno y el hidrógeno no poseen un nutriente específico ya que siempre está en exceso en cualquier medio de cultivo: en el agua, en el aire y nutrientes.

La fuente de azufre, fósforo, potasio y magnesio fueron suministradas en forma de sales minerales. Se suministró una fuente de fósforo y de azufre ya que cumplen funciones importantes en la formación de ácidos nucleicos, y aminoácidos; y una fuente de potasio y el magnesio ya que hacen parte de muchos cofactores de enzimas y en especial el potasio está presente en el RNA de las células (Ertola *et al.*, 1995).

Adicionalmente, para suplir las necesidades de algunos microelementos esenciales para el crecimiento, como el sodio, calcio, el manganeso, el cobre, se seleccionaron sales hidratadas para suplementar estas necesidades. Estas sales hidratadas son de menor costo que las sales secas. La fuente de cobre permite

producir algunas proteínas; y la fuente de manganeso y calcio son cofactores de enzimas. El calcio ayuda a estabilizar la pared celular (Martinko *et al.*, 1998).

Todos los nutrientes fueron seleccionados por su fácil consecución en el mercado, bajo costo y rápido aprovechamiento por la bacteria *P. putida* UA 44 para sus procesos celulares.

5.2 OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DEFINIDO

Se partió de un medio definido basal, al cual se le optimizaron los componentes claves para el crecimiento de la *P. putida* UA44 (glucosa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y MgSO_4) (Mateles y Battat, 1974; Palleroni, 2005). El proceso se optimizó en 3 etapas siguiendo el método de Rosenbrock, donde se logró aumentar la cantidad de biomasa obtenida, las UFC/mL producidas y se disminuyó la cantidad de sustrato consumido.

5.2.1 Primer paso

El primer paso de optimización se realizó aumentando al doble los componentes claves ya seleccionados y sus resultados se observan en la tabla 8.

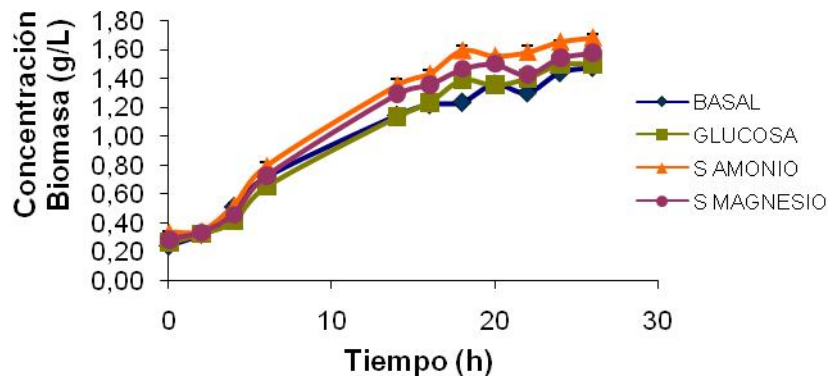
Tabla 8. Primer paso de optimización

	Primer Medio Basal	Primer tamaño de paso	Primer paso de optimización	Aumento (%)	Comparación de medias
Glucosa	16.56	16.56	Biomasa: Negativo	1.6%	P>0.05 (Anexo D)
			UFC/mL: Negativo	1.1%	P>0.05 (Anexo D)
			Y' _{xs} : Positivo	-45%	P<0.05 (Anexo D)
(NH₄)₂SO₄	2.83	2.83	Biomasa: Positivo	13.9%	P<0.05 (Anexo E)
			UFC/mL: Positivo	64.6%	P<0.05 (Anexo E)
			Y' _{xs} : Negativo	-5.5%	P>0.05 (Anexo E)
MgSO₄ 7H₂O	0.25	0.25	Biomasa: Positivo	7.3%	P<0.05 (Anexo F)
			UFC/mL: Positivo	56.8%	P<0.05 (Anexo F)
			Y' _{xs} : Positivo	-34.4%	P<0.05 (Anexo F)
pH final	6.3 ± 0.1				

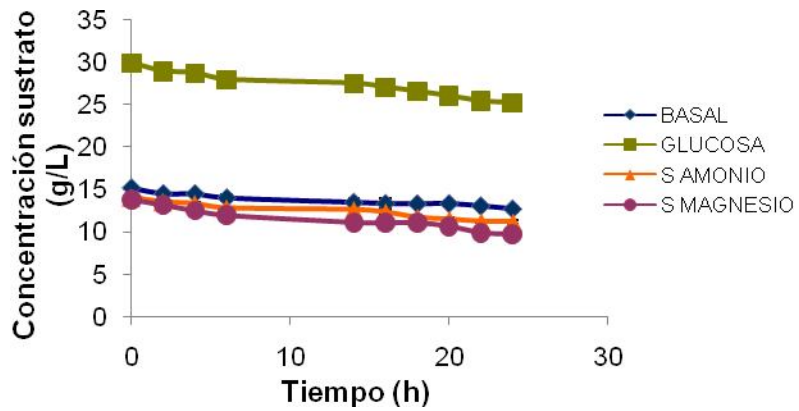
La glucosa es usada por el microorganismo para suplir sus necesidades energéticas, esto es logrado a través de la glucólisis donde la glucosa es metabolizada a piruvato, él cual es posteriormente utilizado en el ciclo del ácido

cítrico para producir en energía y precursores importantes de aminoácidos (Martinko *et al.*, 1998). En el primer paso de optimización no se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) (Tabla 8) al aumentar la concentración inicial de glucosa en cuanto a concentración de biomasa final y UFC/mL (Tabla 8; Gráfica 2). Las rutas metabólicas de la glucosa poseen velocidades de consumo específicas, por lo que la bacteria no es capaz de consumir completamente la fuente de carbono quedando un excedente en el medio (gráfica 3). La disminución en el pH (Tabla 8) pudo inhibir el crecimiento del microorganismo, reduciendo la cantidad de sustrato consumido. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el rendimiento de sustrato en biomasa al aumentar la concentración inicial de glucosa (Tabla 8), el cuál disminuyó un 45% (Tabla 9) de manera significativa (Tabla 8) sin que existiera un aumento en la concentración final de biomasa (Tabla 9) o UFC/mL (gráfica 4). Posiblemente la bacteria al encontrarse en un medio con exceso de glucosa, use una mayor cantidad de sustrato para producción de otros productos como polihidroxicanoatos los cuales son producidos bajo limitaciones de nitrógeno o magnesio (Rojas *et al.*, 2006). La disminución en el rendimiento observado de sustrato en biomasa (Tabla 9) pueda deberse también a la producción de otros polisacáridos (Mateles y Battat 1974).

Gráfica 2. Cinética de crecimiento de la *P. putida* UA 44 en el primer paso de optimización del MD



Gráfica 3. Consumo de glucosa la *P. putida* UA 44 en el primer paso de optimización del MD



Gráfica 4. UFC/mL de la *P. putida* UA 44 en el primer paso de optimización del MD

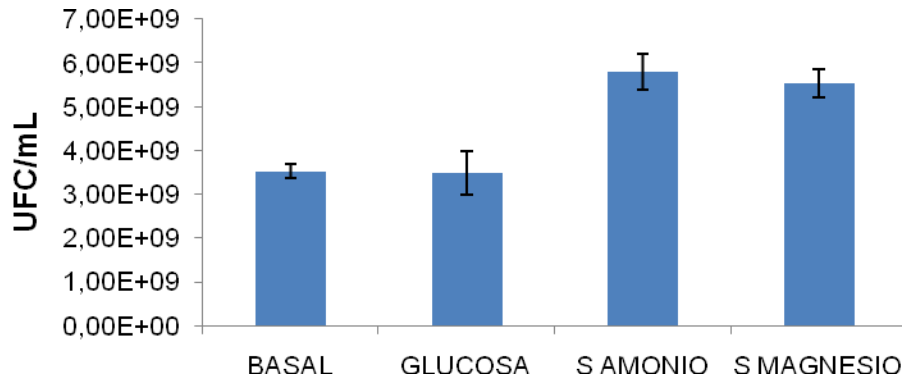


Tabla 9. Rendimiento de sustrato en biomasa y concentración final de biomasa y en el primer tamaño de paso

Primer tamaño de paso	Y'_{xs}	Error estándar	Biomasa g/L	Error Estándar
Basal	0.53	2.10×10^{-2}	1.47	0.49×10^{-3}
Glucosa	0.29	0.30×10^{-2}	1.50	6.35×10^{-3}
Sulfato de Amonio	0.50	1.35×10^{-2}	1.68	2.30×10^{-2}
Sulfato de Magnesio	0.35	0.45×10^{-2}	1.58	1.00×10^{-2}

Al aumentar la concentración inicial de sulfato de amonio se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las variables respuesta (Tabla 8): concentración de biomasa en la fase estacionaria, UFC/mL y Y'_{xs} . La concentración final de biomasa aumentó en un 14% (Tabla 9; Gráfica 2) y las UFC/mL aumentaron en un 65% (gráfica 4). La bacteria usa el nitrógeno para la producción de proteínas importantes para su crecimiento, por lo que al aumentar la concentración inicial de sulfato de amonio la bacteria produce una mayor

cantidad de biomasa y más aun de células viables. El microorganismo consumió el 17% más de sustrato al aumentar la concentración inicial de sulfato de amonio (gráfica 3), sin embargo el rendimiento de sustrato en biomasa no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) con respecto al basal (Tabla 8). La bacteria produjo entonces mayor cantidad de biomasa al aumentar la concentración del sulfato de amonio pero no aumentó su rendimiento de sustrato en biomasa (Tabla 9).

El magnesio también es importante para el crecimiento de la bacteria, ya que está presente como cofactor de muchas enzimas en el metabolismo celular, interviene en procesos bioquímicos básicos como regulador de la estructura del ribosoma, la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos (Martinko *et al.*, 1998). Mateles y Battat (1974) reportaron mejoras en el crecimiento de la *Pseudomonas* sp. al aumentar la concentración de la fuente de magnesio. Tripathy y Srivastava (2006) también obtuvieron mayor crecimiento de la *Pseudomonas putida* al aumentar la concentración de magnesio en el medio. Al aumentar concentración inicial de sulfato de magnesio en el medio se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) de cada una de las variable respuesta con respecto al medio basal (Tabla 8). La concentración de biomasa aumentó en un 7.3% (Tabla 9; Gráfica 2) y las UFC/mL aumentaron en un 65% (gráfica 4). El rendimiento de sustrato en biomasa disminuyó en un 34% (Tabla 9). El microorganismo produjo más biomasa y UFC/mL con un menor rendimiento. El magnesio mejora el crecimiento de la bacteria pero no el rendimiento de sustrato en biomasa. Este ensayo presentó el mayor consumo de glucosa durante el primer paso, 29% (gráfica 3).

En promedio, el pH disminuyó un 15% en cada uno de los ensayos, entre las posibles causas de este fenómeno se encuentra el uso de glucosa como fuente de carbono, la cuál al ser metabolizada por el microorganismo produce CO₂ (ciclo de Krebs) y otros compuestos tales como ácidos grasos que contribuyen a acidificar el medio (Martinko *et al.*, 1998). Chalfan y Mateles (1972) reportan que al usar amonio como fuente de nitrógeno el pH del medio disminuye durante la fermentación.

La concentración inicial de glucosa resultó ser excesiva para el microorganismo (gráfica 3), evidenciándose con un consumo mínimo de 16% en el medio basal y máximo de 29% en el medio con mayor concentración inicial de magnesio del azúcar total suministrado. Por ende se disminuyó su concentración en los pasos subsiguientes.

El aumento de las concentraciones iniciales de sulfato de amonio y sulfato de magnesio durante el primer paso mostraron resultados positivos durante los ensayos.

5.2.2 Segundo paso

Se aumentaron las concentraciones iniciales de sulfato de amonio y magnesio según las respuestas positivas en el primer paso de optimización y se disminuyó la concentración inicial de glucosa debido a las altas cantidad de azúcar residual sin consumirse reportada en el paso anterior. Los resultados de los diferentes ensayos se reportan en la tabla 10.

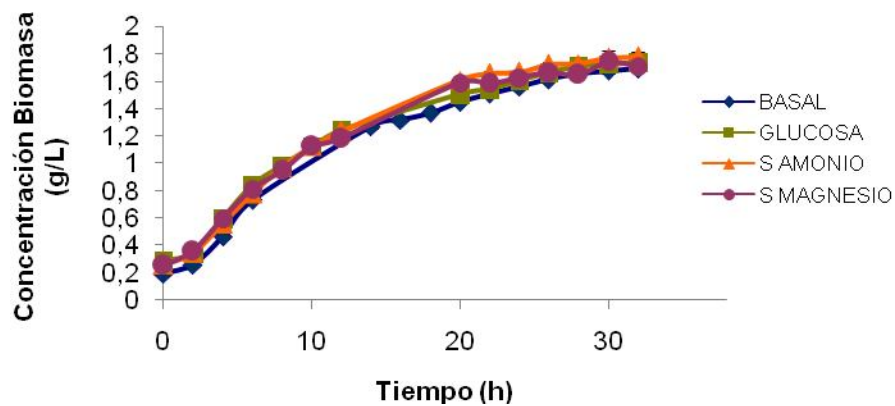
Tabla 10. Segundo paso de optimización

	Según- do Medio Basal	Segúndo tamaño de paso	Segundo paso de optimización	Aumento (%)	Compara- ción de medias
Glucosa	16.56	-11.56	Biomasa: Negativo	2.3%	P>0.05 (Anexo G)
			UFC/mL: Negativo	20.1%	P>0.05 (Anexo G)
			Y' _{xs} : Negativo	24.9%	P>0.05 (Anexo G)
			Biomasa: Negativo	5.4%	P>0.05 (Anexo H)
(NH₄)₂SO₄	5.66	4.00	UFCm/L: Negativo	21.2%	P>0.05 (Anexo H)
			Y' _{xs} : Negativo	22.0%	P>0.05 (Anexo H)
			Biomasa: Negativo	3.8%	P>0.05 (Anexo I)
			UFC/mL: Negativo	13.6%	P>0.05 (Anexo I)
MgSO₄ 7H₂O	0.5	0.50	Y' _{xs} : Negativo	27.1%	P>0.05 (Anexo I)
pH	6.3 ± 0.1				

La disminución en la concentración inicial de glucosa no produjo diferencias significativas (P>0.05) con respecto a las variables medidas (Tabla 10). El

microorganismo consumió el 82% del sustrato durante la fermentación produciendo igual cantidad de biomasa que en el segundo medio basal (gráfica 5). La concentración de glucosa inicial adicionada al medio de cultivo demostró ser capaz de satisfacer las necesidades energéticas de la bacteria *P. putida* UA 44 para el desarrollo de sus diversas rutas metabólicas.

Gráfica 5. Cinética de crecimiento la *P. putida* UA 44 en el segundo paso de optimización del MD



El aumento en la concentración inicial de sulfato de amonio produjo igual cantidad de biomasa en comparación al segundo medio basal (Tabla 11 y gráfica 5). No se obtuvieron diferencias significativas en las UFC/mL, ni en la Y'_{xs} . El microorganismo no requiere más nitrógeno para su metabolismo, por lo que un aumento en la concentración inicial de sulfato de amonio no genera un aumento en las variables respuesta (Tabla 10).

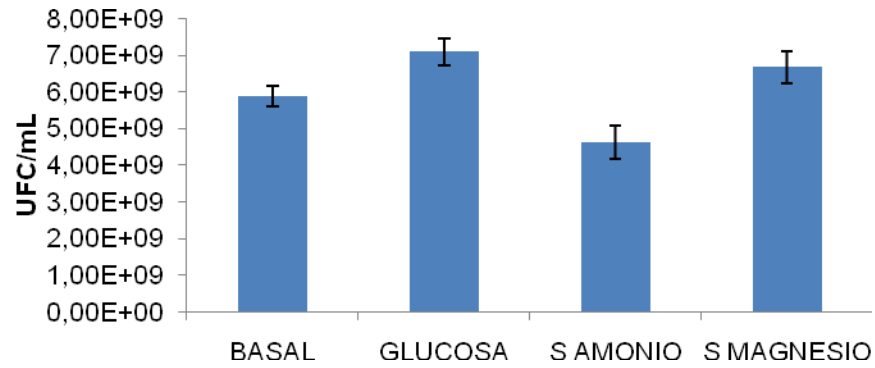
Tabla 11. Rendimiento de sustrato en biomasa y concentración final de biomasa en el segundo tamaño de paso

Segundo tamaño de paso	Y'_{xs}	Error estándar	Biomasa g/L	Error estándar
Basal	0.40	2.65×10^{-2}	1.68	2.42×10^{-2}
Glucosa	0.32	0.60×10^{-2}	1.71	4.18×10^{-2}
Sulfato de Amonio	0.33	2.75×10^{-2}	1.77	5.38×10^{-2}
Sulfato de Magnesio	0.31	2.05×10^{-2}	1.74	0.22×10^{-2}

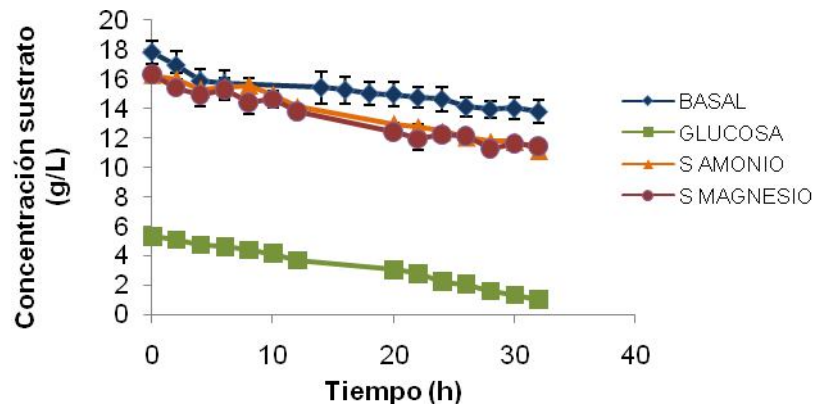
Tampocó se observó un aumento significativo ($P > 0.05$) en la biomasa, ni en las UFC/mL producidas al aumentar la concentración inicial de la fuente de magnesio (Tabla 10). El rendimiento de sustrato en biomasa no muestra ningún cambio significativo ($P > 0.05$) al aumentar la concentración inicial de sulfato de magnesio (Tabla 10).

En las gráficas 5, 6 y 7 se detallan los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados variando las concentraciones de los componentes claves.

Gráfica 6. UFC/mL de la *P. putida* UA 44 en el segundo paso de optimización del MD



Gráfica 7. Consumo de glucosa de la *P. putida* UA 44 en el segundo paso de optimización del MD



Se observa una disminución de pH igual (15%) en cada uno de los ensayos (Tabla 10), debido posiblemente los productos del metabolismo de la glucosa (ácidos grasos y CO₂) por parte del microorganismo (Martinko *et al.*, 1998) y al uso de amonio como fuente de nitrógeno (Chalfan y Mateles, 1972).

El aumento en las concentraciones iniciales de sulfato de amonio y sulfato de magnesio no registraron cambios significativos, igual que la disminución en la concentración inicial de glucosa por lo que se considera que se ha obtenido el medio óptimo

5.2.3 Medio óptimo

El medio óptimo obtenido puede ser observado en la tabla 12.

Tabla 12. Composición del MD optimizado

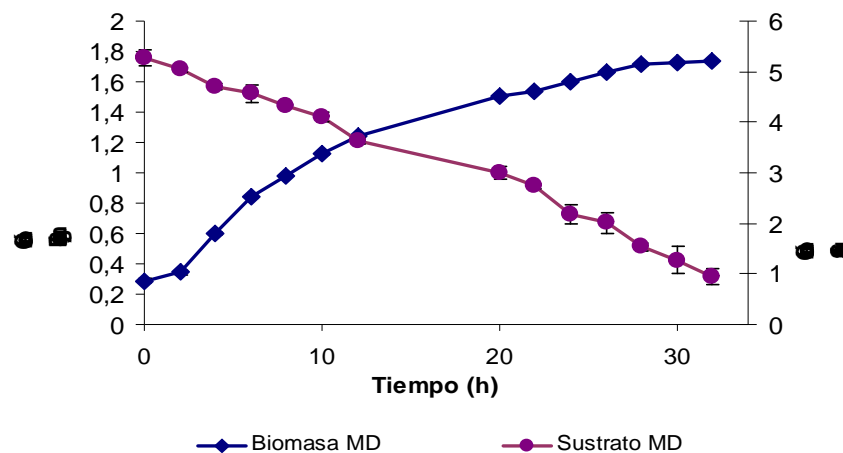
Nutriente	Nutriente (g/L)
C ₆ H ₁₂ O ₆	5.00
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.66
Na ₂ HPO ₄	0.27
K ₂ HPO ₄	0,59
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.20
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.51
CuSO ₄ -5H ₂ O	3.93x10 ⁻³
MnSO ₄ -4H ₂ O	2.03x10 ⁻³
pH inicial	7.2 ± 0.01
pH final	6.3 ± 1

El sulfato de amonio y el sulfato de magnesio aumentaron su concentración inicial en un 100%. La glucosa disminuyó su concentración inicial en un 70%, esto es debido al bajo consumo de sustrato presentado por el microorganismo, lo que permita bajar la concentración inicial de glucosa a lo mínimo, disminuyendo de esta manera costos. La concentración inicial de glucosa es similar a la citada en la literatura. Sun *et al.* (2005) reporta una concentración inicial de glucosa de 10 g/L para el cultivo batch de *Pseudomonas putida*. Fuhrer *et al.* (2004) utilizaron una concentración de 3 g/L de glucosa en un medio definido para el cultivo batch de *Pseudomonas putida*.

El pH medio al final del ensayo fue de 6.3 ± 0.1 (Tabla 14), una disminución considerable en la basicidad del medio, teniendo en cuenta que la bacteria se desarrolla mejor en condiciones básicas (pH 7.0 – 7.4).

La gráfica 8 muestra la cinética de crecimiento de la bacteria en el medio definido optimizado y el consumo de sustrato.

Gráfica 8. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato de la *P. putida* UA 44 MD optimizado

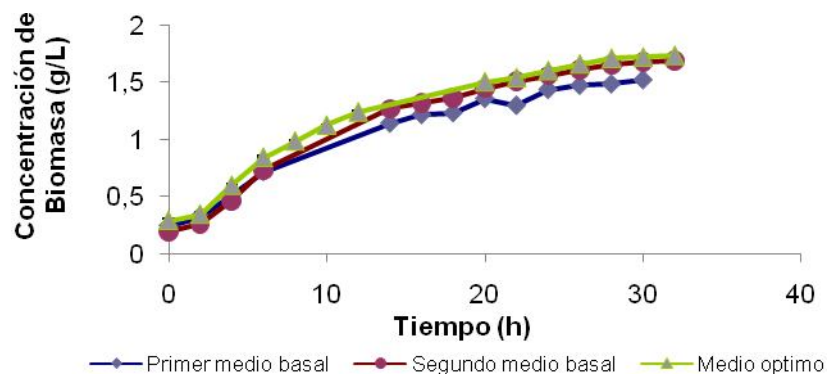


El microorganismo produce la mayor cantidad de biomasa en la fase exponencial (64% fase exponencial; 26% fase de desaceleración). La *P. putida* UA 44 consume el 22% del sustrato en la fase exponencial, durante las primeras 10 horas. Esto permite suponer que la inhibición de crecimiento no se da por sustrato limitante. La inhibición se estaría presentando posiblemente por disminución en el pH del medio o la formación de algún metabolito secundario (gráfica 8).

5.2.3.1 Crecimiento de biomasa

La gráfica 9 muestra el cambio en la cinética de crecimiento de la *P. putida* UA 44 en cada uno de los medios basales obtenidos durante la optimización del MD. La bacteria varía poco su cinética en cada uno de los pasos de optimización del MD.

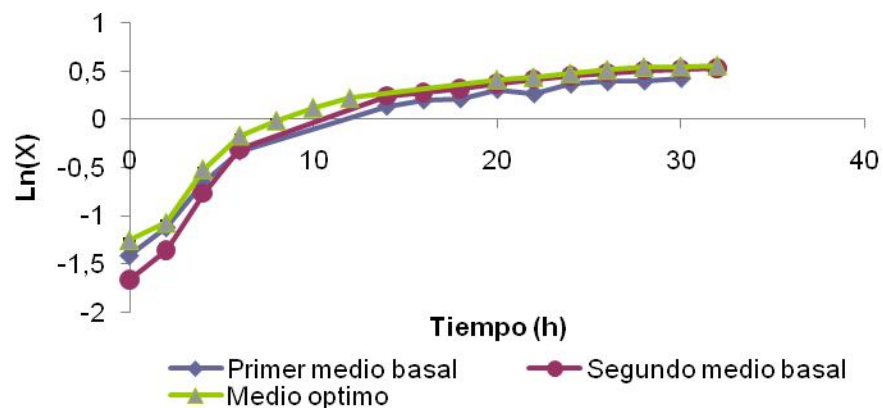
Gráfica 9. Cinética de crecimiento de la *Pseudomonas putida* UA 44 en la optimización del MD



La determinación de las fases de crecimiento microbiano se realiza más cuidadosamente al graficar $\ln x$ vs t (Doran, 1996). En la gráfica 10 se puede observar que no existe una fase de latencia debido a la adaptación de la bacteria en el preinóculo, una fase exponencial en cada una de sus etapas de optimización de 10 horas aproximadamente y una etapa de desaceleración y estacionaria larga.

En cada uno de los pasos de optimización del MD la *P. putida* UA44 mantuvo la misma cinética de crecimiento sin afectar los tiempos de desarrollo de cada fase. Por ende, la concentración de los nutrientes claves (glucosa, sulfato de amonio y sulfato de magnesio) no afectó el tiempo de duración de la fase exponencial.

Gráfica 10. Linelización de la cinética de crecimiento de la *Pseudomonas putida* UA 44 en la optimización del MD

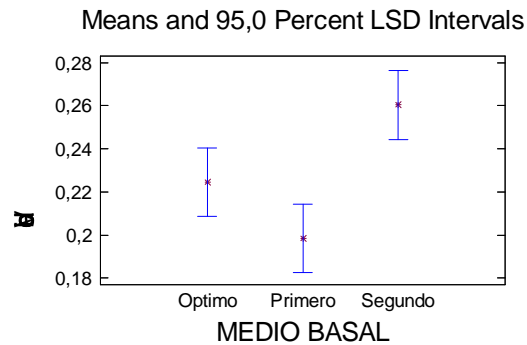


Las velocidades específicas máximas de crecimiento de la *Pseudomonas putida* UA 44 (Tabla 13) en el primer medio basal y el segundo, y entre segundo medio basal y el óptimo, mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) (Anexo K) (Gráfica 11). La velocidad de crecimiento aumentó entre el primer medio basal y el segundo, pero disminuyó en el medio óptimo (Tabla 13), debido a la disminución de la concentración inicial de glucosa. La velocidad de crecimiento fue mayor en el segundo medio basal, el cual tuvo el mayor coeficiente de variación (Tabla 13), lo que muestra que hubo una mayor variabilidad durante este ensayo.

Tabla 13. Velocidad de máxima de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas putida* UA 44 en la optimización del MD

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DEFINIDO	μ_{\max} (1/h)	Error Estandar	Coficiente de Variación (%)
Primer medio basal	0.20	2.68×10^{-3}	2.66
Segundo medio basal	0.26	15.81×10^{-3}	12.15
Medio optimo	0.22	6.31×10^{-3}	5.62

Gráfica 11. Varianza de la velocidad de crecimiento de la *Pseudomonas putida* UA 44 en la optimización del MD

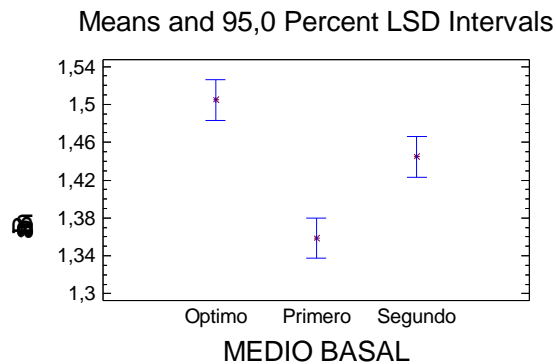


Las concentraciones de biomasa una vez terminada la fase estacionaria, a las 20 horas, aumentaron en cada uno de los pasos de optimización del MD (Tabla 14) y mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Anexo J) (Gráfica 12). La bacteria aumentó en un 9.69% su concentración de biomasa entre el primer medio basal y el medio óptimo.

Tabla 14. Concentración de biomasa a las 20 horas de la *P. putida* UA 44 en la optimización del MD

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DEFINIDO	g/L	Error estándar	Coefficiente de Variación (%)
Primer medio basal	1.36	1.63×10^{-2}	2.40
Segundo medio basal	1.44	0.74×10^{-2}	1.03
Medio óptimo	1.50	1.48×10^{-2}	1.97

Gráfica 12. Varianza de la concentración de biomasa de la *Pseudomonas putida* UA 44 en el la optimización del MD



El aumento en la concentración del sulfato de magnesio y del sulfato de amonio generó mejoras significativas en el aumento de la biomasa en cada uno de los pasos de optimización del MD (Gráfica 12). El cambio en la concentración de glucosa no afectó de manera significativa la concentración final de biomasa pero sí la velocidad máxima de crecimiento. La *P. putida* AU 44 aumentó de manera significativa su concentración entre el segundo medio basal y el óptimo, en esta etapa solo hubo disminución de la concentración de glucosa inicial en el medio, por lo cual esta medida puede deberse a una mayor presencia de células en el medio.

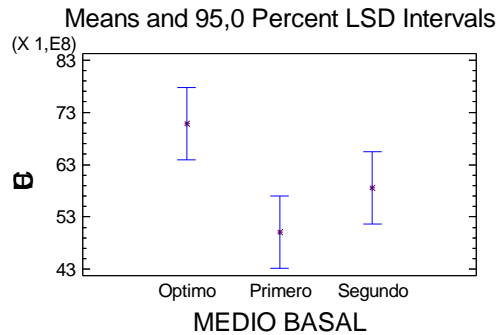
5.2.3.2 Formación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

En la tabla 15 se observa que el medio óptimo produjo el mayor número de UFC/mL (7.09×10^9), pero también fue el que mostró el mayor error estándar. No se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) ni entre el primer medio basal y el segundo, ni entre el segundo medio basal y el óptimo, pero sí entre el primer medio basal y el medio óptimo ($P < 0.05$) (Anexo L) (Gráfica 13). La bacteria aumentó las UFC/mL en cada uno de los medios basales durante el proceso de optimización (Tabla 15). La mayor cantidad de UFC/mL en el medio óptimo se debe a la mayor concentración de nitrógeno y magnesio con respecto al medio basal inicial. La razón por la cual el medio óptimo produce mayor cantidad de UFC/mL con respecto al segundo medio basal, puede deberse a que en el segundo medio basal la bacteria posiblemente utiliza el exceso de glucosa para la producción de otros compuestos como polihidroxicanoatos, mientras en el medio óptimo la glucosa posiblemente es destinada únicamente a la producción de células.

Tabla 15. UFC/mL de la *P. putida* UA 44 en la optimización del MD

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DEFINIDO	UFC/mL	Error Estandar	Coefficiente de Variación (%)
Primer medio basal	5.01×10^9	8.54×10^8	7.62
Segundo medio basal	5.89×10^9	8.85×10^8	6.76
Medio óptimo	7.09×10^9	1.16×10^9	7.32

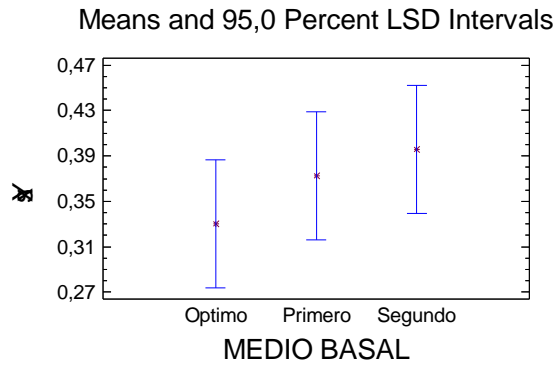
Gráfica 13. Varianza de las UFC/mL de la *Pseudomonas putida* UA 44 en la optimización del MD



5.2.3.3 Consumo de sustrato

La fuente de carbono (glucosa) disminuyó su concentración en cada uno de los pasos de optimización. El rendimiento de sustrato en biomasa de la *P. putida* UA 44 disminuyó un 40% durante el proceso de optimización, sin embargo, no existe diferencias significativas ($P > 0.05$) (Anexo L) entre ellos (gráfica 14). En el primer medio basal y en el segundo la glucosa no fue consumida en su totalidad (gráfica 15), indicando que el microorganismo detuvo su crecimiento, no por falta de sustrato sino probablemente por inhibición por parte de la concentración de biomasa, por una reducción en el pH en el medio, por la producción de un metabolito secundario, por la falta de oxígeno disuelto o por la escasez de uno de los nutrientes del medio.

Gráfica 14. Varianza del rendimiento de sustrato en biomasa para *Pseudomonas putida* UA44 en el proceso de optimización del MD

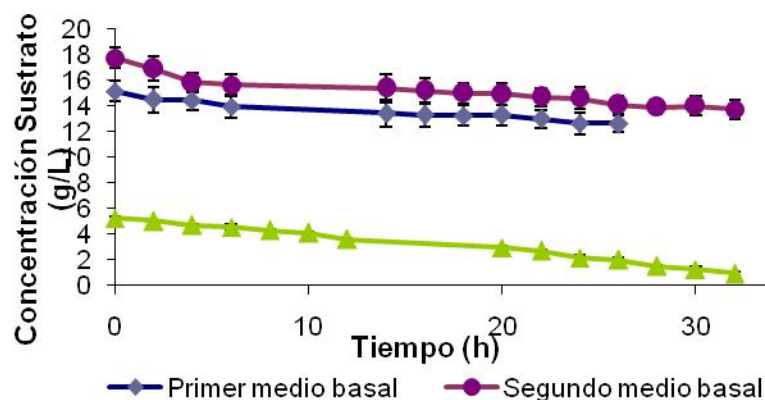


El segundo medio basal presentó el mayor rendimiento de consumo de sustrato (Y_{xs}) pero tenía el mayor coeficiente de variación (Tabla 16), por lo que el ensayo presentó mayor variabilidad que los otros. El segundo medio basal poseía una mayor concentración inicial de glucosa, sulfato de amonio y sulfato de magnesio, por lo que había una mayor disponibilidad de nutrientes y fuente de energía para los procesos metabólicos del microorganismo. Por lo que hubo un mejor aprovechamiento del sustrato para el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los rendimientos de sustrato en biomasa en cada uno de los medios obtenidos (gráfica 14).

Tabla 16. Rendimiento de sustrato en biomasa para *P. putida* UA 44 en el proceso de optimización del MD

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DEFINIDO	Y'xs	Error estándar	Coefficiente de Variación (%)
Primer medio basal	0.37	4.49×10^{-2}	24.11
Segundo medio basal	0.40	3.95×10^{-2}	19.98
Medio óptimo	0.33	1.26×10^{-2}	7.63

Gráfica 15. Consumo de sustrato de la *P. putida* UA 44 en el proceso de optimización del MD



La *P. putida* UA 44 consumió poca cantidad de sustrato (gráfica 15). Entre las razones se encuentra la disminución en el pH (Tablas 8, 10 y 12). El aumento en la acidez del medio puede contribuir a disminuir la velocidad de crecimiento de la bacteria y por ende la cantidad de sustrato consumido. Otra razón es inhibición de crecimiento por concentración de biomasa. Después de 10 horas la bacteria termina su fase estacionaria, por lo que su cinética de crecimiento se desacelera y disminuye la cantidad de sustrato que se consume. Posiblemente, la velocidad de crecimiento celular se vio afectada por la producción de algunos metabolitos

secundarios por parte de la bacteria. Palleroni (2005) reporta que la *Pseudomona putida* puede producir diversas clases de metabolitos, entre los que se encuentran las pioverdinas y piocianinas los cuáles pueden inhibir el crecimiento del microorganismo.

Nagai (1979) reporta rendimientos de sustrato en biomasa de 0.38 g/g usando como fuente de carbono la glucosa para cultivos aerobios. Los nutrientes seleccionados resultaron ser favorables para crecimiento de la bacteria. Esto se observa en la concentración de biomasa producida y en la formación de UFC/mL.

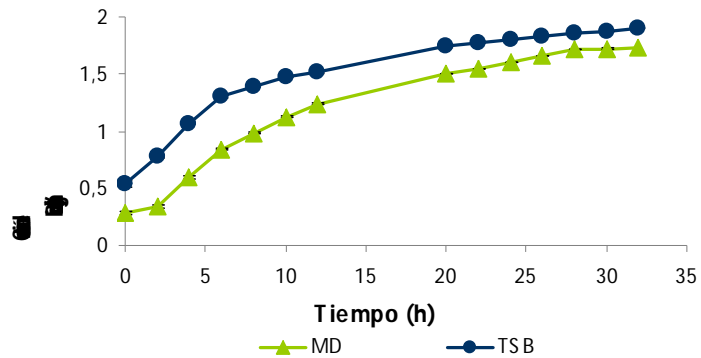
5.3 COMPARACIÓN MD OPTIMIZADO Y EL TSB.

El medio de cultivo optimizado final es comparado con un medio semicomplejo. En este caso el medio de cultivo semicomplejo seleccionado es el TSB, el cual fue reportado por Ramírez (2004) con buenos resultados para el cultivo de la bacteria *P. putida* UA44.

5.3.1 Crecimiento de la biomasa

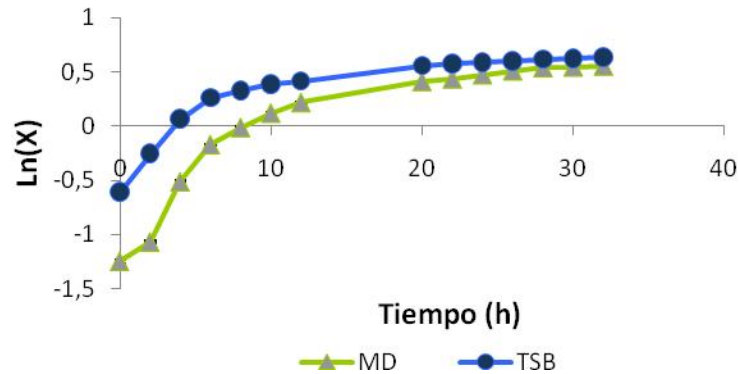
Al compararse la cinética de crecimiento entre el MD optimizado y el TSB (Gráfica 16) se observa una mayor producción de biomasa en el TSB.

Gráfica 16. Cinética crecimiento de la *Pseudomonas putida* UA 44 en el MD optimizado y en el TSB



Como ambos preinóculos fueron desarrollados de la misma manera, la gráfica 16 indica que el TSB ostentó mejores características para el crecimiento de la bacteria por lo que registró mayor concentración de biomasa en la muestra tomada en el tiempo cero. El TSB provee un buen soporte de crecimiento para la *P. putida* UA 44. En este medio las peptonas proveen la fuente de nitrógeno. La Dextrosa provee la fuente de carbohidratos y energía. El cloruro de sodio tiene su función en el balance osmótico y el fosfato dipotásico actúa como buffer (www.mcd.com.mx/pdfs/CALDO%20SOYA%20TRIPTICASEINA.pdf).

Gráfica 17. Linealización de la cinética de crecimiento de la *Pseudomonas putida* UA44 en el MD optimizado y en el TSB



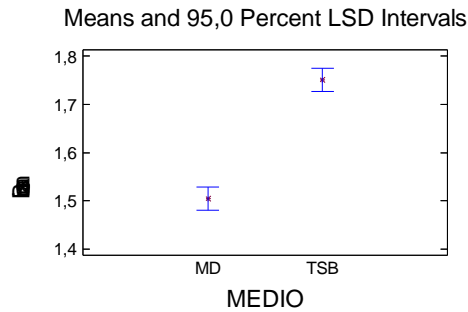
La gráfica 17 muestra que ambos medios llegan a la fase estacionaria prácticamente a las 10 horas. El medio semicomplejo presentó una mayor concentración inicial, debido a su preinóculo.

La tabla 17 indica que el medio de cultivo TSB produjo la mayor concentración de biomasa a las 20 horas (14%), con diferencias significativas ($P < 0.05$) (gráfica 18) (Anexo O). El coeficiente de variación fue menor en el ensayo realizado en el medio TSB (Tabla 17), por lo que este ensayo presentó una mayor variabilidad.

Tabla 17. Concentración de biomasa a las 20 horas de la *P. putida* UA 44 en el MD optimizado y en el TSB

MEDIO DE CULTIVO	g/L	Error Estandar	Coficiente de Variación (%)
DEFINIDO OPTIMIZADO	1.50	1.48×10^{-2}	1.97
TSB	1.75	1.26×10^{-2}	1.44

Gráfica 18. Varianza de la concentración de biomasa de la *Pseudomonas putida* UA 44 en el MD optimizado y en el TSB

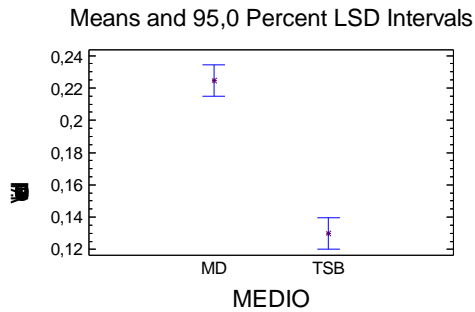


La velocidad de crecimiento es menor en el medio de cultivo TSB (Tabla 18). Es posible que la menor velocidad máxima de crecimiento en el TSB se deba a que la bacteria se encuentra ya cercana a la fase de desaceleración, esto es debido a la mayor concentración de biomasa presente en el preinóculo del TSB con respecto al del MD optimizado, por lo que su velocidad de crecimiento máxima disminuye. Se dieron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ambas velocidades máximas de crecimiento (gráfica 19) (Anexo N).

Tabla 18. Velocidad de máxima de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas putida* UA 44 en el medio definido optimizado y en el TSB

MEDIO DE CULTIVO	μ_{\max} (1/h)	Error Estandar	Coefficiente de Variación (%)
DEFINIDO OPTIMIZADO	0.22	6.31×10^{-3}	5.62
TSB	0.13	4.85×10^{-3}	7.46

Gráfica 19. Varianza de la velocidad de crecimiento de la *Pseudomonas putida* UA 44 en el MD optimizado y en el TSB



5.3.2 Formación de colonias

En el caso de las UFC/mL no se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el medio de cultivo semicomplejo y el medio de cultivo definido optimizado (Gráfica 20) (Anexo Q).

Gráfica 20. Varianza de UFC/mL de la *Pseudomonas putida* UA 44 en el MD optimizado y en el TSB

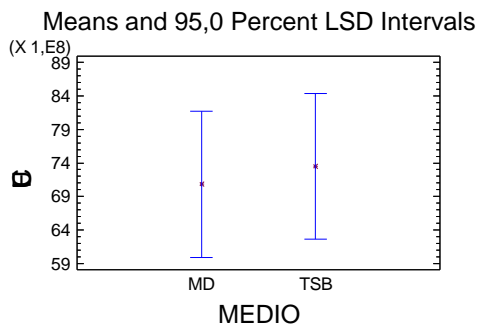


Tabla 19. UFC/mL de la *P. putida* UA 44 en el MD optimizado y en el TSB

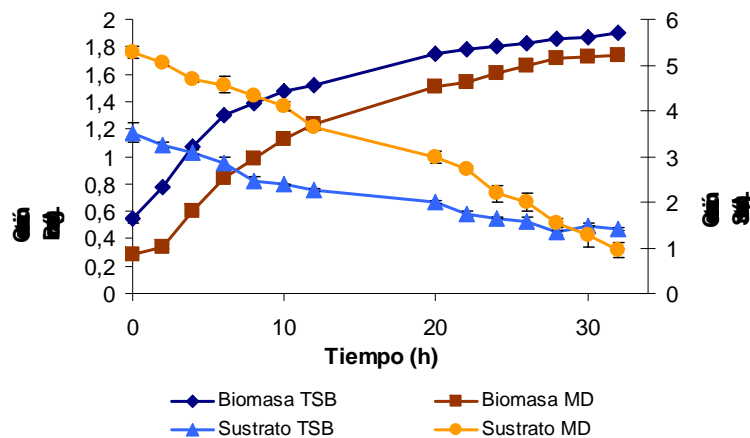
MEDIO DE CULTIVO	UFC/mL	Error Estandar	Coefficiente de Variación (%)
DEFINIDO OPTIMIZADO	7.09×10^9	1.16×10^9	7.32
TSB	7.35×10^9	4.95×10^8	6.73

Ambos medios, el TSB y el MD optimizado, produjeron igual número de UFC/mL, pero el TSB produjo mayor cantidad de biomasa. Esto pudo deberse a que en el medio TSB existieran un mayor número de células no viables que en el MD optimizado.

5.3.3 Consumo de sustrato

La bacteria consume más sustrato en el medio TSB que en el MD optimizado, lo que coincide con una mayor cinética de crecimiento (gráfica 21) y esto se ve reflejado en el rendimiento (Tabla 20).

Gráfica 21. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato en ambos medios de la *P. putida* UA 44



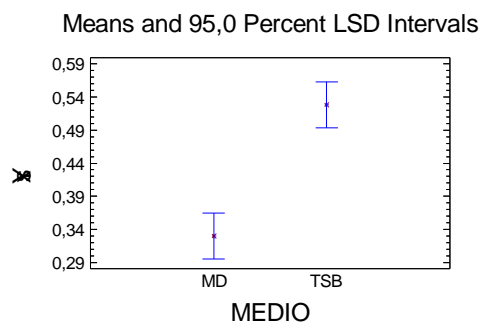
En la gráfica 21 se observa la comparación de la cinética de crecimiento de la bacteria y el consumo de sustrato entre el MD optimizado y el TSB. La bacteria consumo en el TSB el 32% del sustrato durante la fase exponencial y un 38% en la fase de desaceleración.

Tabla 20. Rendimientos de sustrato en biomasa para *P. putida* UA 44 en el MD optimizado y en el TSB

MEDIO DE CULTIVO	Y'xs	Error estándar	Coefficiente de Variación (%)
DEFINIDO OPTIMIZADO	0.33	1.3×10^{-2}	7.63
TSB	0.53	2.5×10^{-2}	9.63

El TSB tuvo mayor rendimiento observado de sustrato en biomasa que el MD optimizado, indicando que se requiere una mayor cantidad de sustrato para producir una cantidad determinada de biomasa en el MD que en el TSB. Posiblemente la bacteria consume mayor cantidad de sustrato en el MD optimizado para su mantenimiento celular que en el medio TSB por lo que produce una menor concentración de biomasa final.

Gráfica 22. Varianza del Rendimientos de sustrato en biomasa para *Pseudomonas putida* UA 44 en el MD optimizado y en el TSB



Existen además diferencias significativas entre ambos medios ($P < 0.05$) (gráfica 22) (Anexo P). La bacteria entonces produce más biomasa en el TSB que en el MD optimizado.

5.3.4 Costos

En la tabla 21 se observan los costos que requiere producir un 1L de medio de cultivo en MD optimizado y TSB (Anexo V).

Tabla 21. Costo de 1 L de medio de cultivo MD y TSB

	<i>Valor</i>		
	<i>gr/L</i>	<i>\$/gr</i>	<i>\$</i>
C₆H₁₂O₆	5.00	114.00	570.00
(NH₄)₂SO₄	5.66	78.00	441.69
Na₂HPO₄	0.28	240.00	65.94
K₂HPO₄	0.59	221.00	130.40
CaCl₂ 2H₂O	0.20	147.00	29.720
MgSO₄ 7H₂O	0.51	162.00	82.16
CuSO₄ 5H₂O	3.93x10 ⁻³	104.00	0.40
MnSO₄ 4H₂O	2.03x10 ⁻³	448.00	0.91
MD OPTIMIZADO			1321.23
TSB	40	298	11920

La producción del microorganismo requiere de otros costos directos e indirectos, que también conllevan gastos operacionales y administrativos. Los procesos Downstream son iguales para ambos medios, por lo que sus costos en la etapa de

separación entre el medio de cultivo y la bacteria son iguales. Estos costos por ser iguales para ambos medios de cultivo no se comparan.

El medio de cultivo TSB, que es un medio ya preparado y listo para su uso posee el mayor costo de producción de biomasa (Tabla 22). Por lo cual se puede decir que es más costoso producir un gramo de biomasa en TSB que con el MD optimizado. Sin embargo, el medio de cultivo mostró resultados similares para la producción de biomasa de la *Pseudomonas putida* UA 44

Tabla 22. Costo por gramo de biomasa

MEDIO DE CULTIVO	\$ / gr Biomasa
MD	880.82
TSB	6811.43

5.4 MODELO MATEMÁTICO

5.4.1 Biomasa

5.4.1.1 MD optimizado

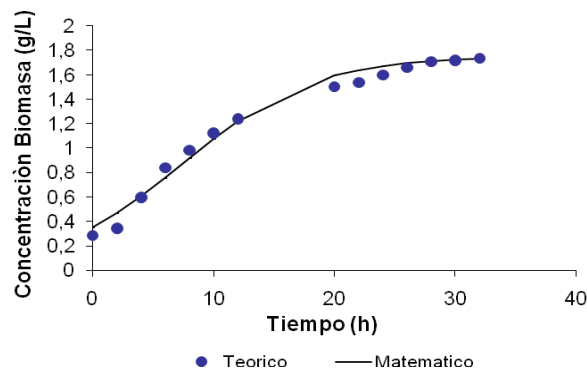
Los parámetros para el modelo matemático de la cinética de crecimiento de la *Pseudomonas putida* UA44 en el MD optimizado una vez introducidos en la regresión no lineal en Polymath 5.1 se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Parámetros del modelo matemático de la cinética de crecimiento de la *P. putida* UA4 4 en el MD optimizado

Parámetro	Valor	Unidades
μ_{\max}	0.18	1/h
X_0	0.35	g/L

En la gráfica 23 se observa que el modelo matemático se ajusta de manera satisfactoria a los datos tomados de formación de biomasa durante la etapa experimental, para el caso del MD optimizado, $R^2 = 0.984$ (Anexo R).

Gráfica 23. Comparación entre los datos experimentales y calculados de la producción de biomasa de la *P. putida* UA 44 en el MD optimizado



5.4.1.2 TSB

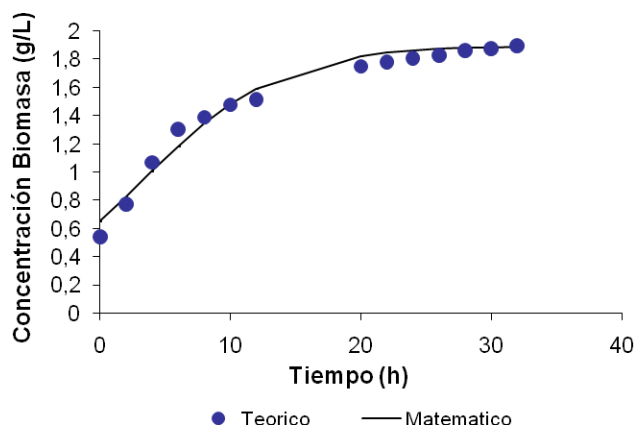
Los parámetros para el modelo matemático de la cinética de crecimiento de la *Pseudomonas putida* UA 44 en TSB se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Parámetros del modelo matemático de la cinética de crecimiento de la *P. putida* UA 44 en TSB

Parámetro	Valor	Unidades
μ_{\max}	0.19	1/h
X_0	0.65	g/L

En la gráfica 24 se observa que el modelo matemático se ajusta de manera satisfactoria a los datos tomados de formación de biomasa durante la etapa experimental, para el caso del TSB, $R^2 = 0.976$ (Anexo S).

Gráfica 24. Comparación entre los datos experimentales y calculados de la producción de biomasa de la *P. putida* UA 44 en el TSB



Las velocidades específicas de crecimiento (μ_{\max}) teóricas son similares entre el TSB y el MD optimizado (Tablas 23 y 24). Sun *et al.* (2005) reportaron una velocidad específica máxima de crecimiento para la *Pseudomana putida* KT2440 en la etapa batch de 0.25 h^{-1} usando glucosa como única fuente de carbono.

5.4.2 Sustrato

5.4.2.1 MD optimizado

Los parámetros para el modelo matemático del consumo de sustrato de la *Pseudomonas putida* UA44 en el MD optimizado se muestran en la tabla 25.

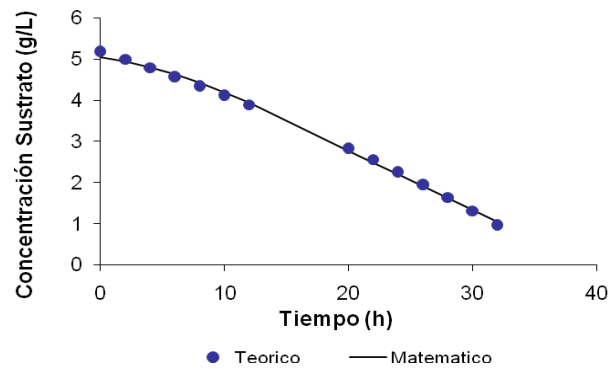
Tabla 25. Parámetros del modelo matemático del consumo de sustrato de la *P. putida* UA44 en el MD optimizado

Parámetro	Valor	Unidades
S_0	5.05	g/L
Y_{xs}	0.65	g/g
m_s	8.20×10^{-2}	g/(g*h)

Los valores de sustrato inicial, rendimiento teórico de sustrato en biomasa y coeficiente de mantenimiento de ajustan a valores reportados en la literatura (Liu *et al.*, 2003)

En la gráfica 25 se observa que el modelo matemático se ajusta de manera satisfactoria a los datos tomados de consumo de sustrato durante la etapa experimental, para el caso del MD optimizado, $R^2 = 0.998$ (Anexo S)

Gráfica 25. Comparación entre los datos experimentales y calculados del consumo de sustrato de la *P. putida* UA 44 en el MD optimizado



5.4.2.2 TSB

Los parámetros para el modelo matemático del consumo de sustrato de la *Pseudomonas putida* UA44 en el MD optimizado se muestran en la tabla 26.

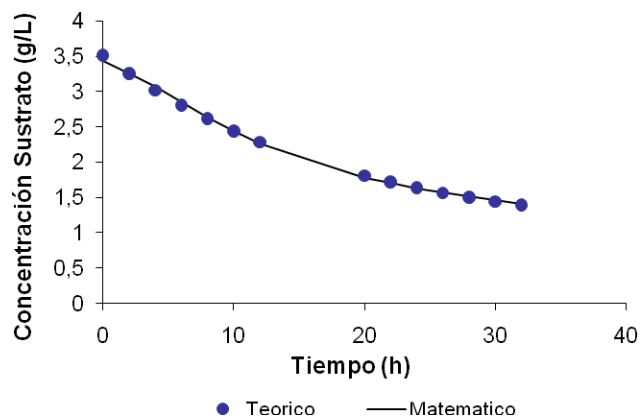
Tabla 26. Parámetros del modelo matemático del consumo de sustrato de la *P. putida* UA 44 en el TSB

Parámetro	Valor	Unidades
S_0	3.43	g/L
Y_{xs}	1.04	g/g
m_s	1.22×10^{-2}	g/(g*h)

Los datos mostrados en la tabla 26 son acordes a los reportados por otros autores (Liu *et al.*, 2003).

En la gráfica 26 se observa que el modelo matemático se ajusta de manera satisfactoria a los datos tomados de consumo de sustrato durante la etapa experimental, para el caso del TSB, $R^2 = 0.998$ (Anexo T)

Gráfica 26. Comparación entre los datos experimentales y calculados del consumo de sustrato de la *P. putida* UA 44 en el TSB



Los modelos matemático usados para evaluar la cinética de crecimiento y el consumo de sustrato de la *P. putida* UA 44 tuvieron un excelente ajuste a los datos reales en ambos medios de cultivo.

El rendimiento teórico (Y_{xs}) es mayor que el observado (Y'_{xs}), esto es debido a que el modelo matemático considera que el sustrato solo es usado para la producción de biomasa y no tiene en cuenta los procesos necesarios para el mantenimiento de la célula.

El coeficiente de mantenimiento indica la cantidad de sustrato usado en otros procesos celulares de la bacteria como el recambio de enzimas, componentes de la pared celular, transporte de iones, movilidad, etc. Los coeficientes de

mantenimiento hallados (m_s) se ajustan a los reportados en la literatura para otros microorganismos (Liu *et al.*, 2003; Benkortbi *et al.*, 2007), los cuales deben estar en rangos de 0.02-0.1 g/(g*h) (White *et al.*, 1995). El coeficiente de mantenimiento del TSB es menor que el del MD optimizado (Tablas 25 y 26), lo que muestra que el microorganismo usa más el medio semicomplejo para su crecimiento que el MD optimizado (gráfica 16). La bacteria consume más sustrato en la fase de desaceleración en el MD optimizado para su mantenimiento que en el medio TSB (gráfica 21).

La glucosa y el sulfato de amonio son los principales nutrientes que aportan en el mantenimiento celular de la bacteria en el medio MD optimizado por ser las fuentes de carbono y nitrógeno. El sulfato de amonio y magnesio mostraron importancia en el mantenimiento de la célula, la concentración inicial de ambos nutrientes aumentó un 100% en el proceso de optimización del medio definido.

CONCLUSIONES

El diseño del medio de cultivo definido basal permitió el crecimiento de la cepa *P. putida* UA44. La cual se desarrolló favorablemente en este medio con una velocidad específica de crecimiento de 0.198 h^{-1} , rendimiento de sustrato en biomasa de 0.37 g/g y una disminución de la concentración de glucosa del 13.2% a las 20 horas. La concentración inicial de glucosa (16.56 g/L) resultó ser excesiva para el microorganismo. Los nutrientes seleccionados fueron favorables para el crecimiento de la bacteria.

El método de Rosenbrock mostró ser eficiente para la optimización de medios de cultivo variando la concentración de sus componentes claves. El empleo de este método permitió en un número corto de etapas la optimización del medio de cultivo definido. Se observó poco aumento en las variables respuesta entre el medio de cultivo definido basal y el óptimo. Las UFC/mL aumentaron 29.3%, la μ_{max} aumentó 11.67%, el Y'_{xs} disminuyó en un 12.83% y la concentración de biomasa aumentó 9.69%. La incidencia de los elementos escogidos para el mejoramiento del medio de cultivo definido fue poca, esto se observa en el bajo aumento de la biomasa.

La concentración de glucosa inicial disminuyó un 70% del medio basal inicial al medio óptimo. El sulfato de magnesio y el sulfato de amonio aumentaron un 100% cada uno en el proceso de optimización del medio de cultivo definido.

Es recomendable el uso de Rosenbrock para el mejoramiento de medios de cultivos en laboratorio, por ser un método rápido y estable, que llega la región óptima en un número corto de pasos, ahorrando tiempo y número de ensayos.

El medio de cultivo semicomplejo (TSB) exhibió mejores resultados para el crecimiento de la bacteria *Pseudomonas putida* UA44 que el medio definido optimizado. El TSB produjo 9.2% más concentración de biomasa al terminar el ensayo, un rendimiento de sustrato en biomasa 37.47% mayor que el medio de cultivo definido optimizado. La velocidad de crecimiento fue 46% mayor en el medio definido optimizado (0.22 h^{-1}) que en el TSB (0.13 h^{-1}), sin embargo, esta diferencia se debe a la mayor concentración de biomasa presente en el preinóculo del TSB. Las UFC/mL de ambos medios no mostraron ninguna diferencia significativa, por lo cual ambos medios producen cantidades similares de células viables. Esto demuestra la eficiencia del medio definido optimizado para el cultivo de la bacteria *Pseudomonas putida* UA 44.

El TSB mostró mejores resultados para un rápido crecimiento de la bacteria *Pseudomonas putida* UA 44, pero el costo para obtener 1L de solución bacteriana es mayor que el medio definido optimizado. Sin embargo, el medio definido optimizado puede suplir adecuadamente las necesidades nutricionales de la bacteria a un menor costo. Por lo tanto, se puede reemplazar el medio de cultivo TSB por el medio de cultivo definido, obteniendo un menor rendimiento en la producción de la *Pseudomonas putida* UA44 a un menor costo económico.

RECOMENDACIONES

Elaborar un mejor protocolo para inocular ambos medios con la misma densidad de preinóculo, a fin de comparar las cinéticas de crecimiento de ambos medios de una mejor manera.

Evaluar otros parámetros que puedan afectar el crecimiento del microorganismo (pH y velocidad de agitación) con el fin de mejorar las condiciones de cultivo en el MD.

Realizar pruebas in vitro para verificar que el medio MD no afecta la capacidad de producción de ACC deaminasa de *P. putida*, y realizar pruebas in vivo para determinar si el medio de cultivo afecta la promoción de crecimiento vegetal de la planta de banano.

BIBLIOGRAFÍA

Aiba, S.; Humphrey, A.E. y Mills, N.F. 1973. Biochemical Engineering. 2da edición. Academic Press, New York. pp 433

Bashan, Y. y Levanony, H. 1990 Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbial. 36: 591-608.

Bashan, Y.; Ream, Y.; Levanony, H. y Sade, A. 1989. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. Can. J. Bot. 67: 1317-1324.

Benkortbi, O.; Hanini, S. y Bentahar, F. 2007 Batch kinetics and modelling of Pleuromutilin production by *Pleurotus mutilis*. Biochemical Engineering Journal. 36: 14-18

Box, G.E.P. y Wilson, K.B. 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. Journal of the Royal Statistical Society. Ser. B. 13: 1-45.

Brimecombe, M.J.; De Leij, F.A. y Lynch, J.M. 2001. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. En: Pinton, R.; Varanini, Z. y Nampieri, P. (Eds). The Rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker Inc., New York. pp. 95-140.

Chalfan, Y. y Mateles, R.I. 1972. New pseudomonad utilizing methanol for growth. Applied Microbiology. 23:135-140.

- Cocaign-Bousquet, M.; Garrigues C, Novak L.; Lindley ND, Loubiere P. 1995. Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. J Appl Bacteriol 79: 108-116
- Curl, E.A. y Truelove, B. 1986. The Rhizosphere. Springer-Verlag, New York. pp 288.
- Doran, M.P. 1999. Bioprocess Engineering Principles. Academic Press Limited, London. pp 439
- Elvira, M.H; Raul R.R. y Graciela, Savoy de Giori. 2004 Nutritional Requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in a Chemically Defined Medium. Current Microbiology. 49: 341-345.
- Ertola, R.J.; Giulietti, A.M.; Castillo, F.J. 1995. Design, Formulation and Optimization of Media. En: Asenjo, J.A. y Merchuk, J.C. (Eds). Bioreactor System Design. Marcel Dekker, New York. pp. 89-137
- Fuhrer, T.; Fischer, E.; y Saer, U. 2004. Experimental Identification and Quantification of Glucose Metabolism in Seven Bacterial Species Journal of Bacteriology. 187: 1581-1590.
- Gong, H. y Lun, S. 1996. The kinetics of lysine batch fermentation. Chinese Journal of Biotechnology. 12: 219-225
- Hofer, H.; Mandl, T. y Steiner, W. 2002. Acetopyruvate hydrolase production by *Pseudomonas putida* 01 – optimization of batch and fed-batch fermentations. Appl Microbiol. Biotechnol. 60: 293-233.

Kennedy, M. y Krouse, D. 1999. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 23: 456–475.

Kim, Y.H.; Kang, S.W.; Lee, J.H.; Chang, H.I.; Yen, C.W.; Paik, H.D.; Kang, C.W.; Kim, y Seung, W. 2007. High Cell Density Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in Fed-batch Culture for the Production of β -Glucan. *J. Ind. Eng. Chem.* 13: 153-158.

Kloepper, J.W. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: Metting, F.B. Jr. (Ed). *Soil Microbial Ecology: Applications in agricultural and environmental Management*. Marcel Dekker Inc., New York. pp. 255-274.

Kloepper, J.W. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria. En: Okon, Y. (Ed.). *Azospirillum/Plant Associations*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 137-166.

Kloepper, J.W.; Leong, J.; Taintor, M. y Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant-growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature (Lond)*: 286: 885-886.

Kloepper, J.W.; Lifshitz, R. y Zablotowicz, R.M. 1989. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-44.

Liu, J.Z.; Weng, L.P.; Zhang, Q.L.; Xu, H, y Ji, L.N. 2003. A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*. 14: 137-141.

Lucy, M.; Reed, E. y Glick, R. 2004. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86: 1-25.

Martínez O., y Kloepper, J.W. 2002. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR) y resistencia sistémica inducida. *Memorias XXII Congreso ASCOLFI, Bogotá Julio 3 al 6*. p. 134-137.

Martinko, J.M.; Madigan, M.T. y Parker, J. 1998. *BROCK Biología de los microorganismos*. Prentice Hall, Madrid. pp 986

Mateles, R.I. y Battat, E. 1974. Continuous Culture Used for Media Optimization. *Applied and Environmental Microbiology*. 28: 901-905.

MERCK. 2007. *Catalogo MERCK*. Editorial MERCK

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*. 13: 420-428.

Morgan, S.L. y Deming, S.N. 1974. Simplex Optimization of Analytical Chemical Methods. *Analytical Chemistry*. 46: 1170-1181

Nagai, S. 1976. Mass and Energy Balances for Microbial Growth. En: Ghose, T.K.; Fiechter, A. y Blakebrough, N. (Eds.). *Biochemical Engineering*. Springer-Verlag, New York. pp. 53

Nair, S.R. y Panda, T. 1997, Statistical optimization of medium components for improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering*. 16: 169-173.

Neumann, G. y Römheld, V. 2001. The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. En: Pinton, R.; Varanini, Z. y Nannipieri, P. (Eds). The Rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker Inc., New York. pp 41-93.

Observatorio Agrocadenas Colombia. 2005. "La cadena del banano en Colombia: Una Mirada global de su estructura y dinámica. 1991-2005". Documento de Trabajo No. 60. Bogotá D.C., Marzo pp 51.

Palleroni, N.J. 2005 Genus I. *Pseudomonas*. En: Garrity, G.M; Boone, D.R. y Castenholz, R.W. (Eds). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2 ed. Vol 2. Part B. Springer, Estados Unidos. pp. 323-379

Plackett, R.L. y Burman, J.P. 1946. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*. 33: 305-325.

Powell, P.E.; Leong, J.; Cline G.R.; Reid, C.P.P. y Szaniszto, P.J. 1980. Occurrence of hidroxamate siderophore iron chelators in soil. *Nature (Lond)*. 287: 833-834.

Ramírez, C.A. 2004. Aislamiento y evolución de rizobacterias con potencial biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas de banano. Tesis: M.Sc. en Biotecnología. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

Riverón, L.A. 2006. Optimización de procesos biotecnológicos. En: Memorias II Congreso Internacional Diseño de Procesos Químicos y Biotecnológicos, Diseño de Procesos y Productos: Herramientas Tecnológicas para impulsar el Desarrollo. Agosto 2 al 4 de 2006, Universidad EAFIT, Medellín. pp. 6-10

Rodriguez, H.; Enriquez, A. y Volfova, O. 1983. Optimization of culture medium composition for cellulolytic bacteria by mathematical methods. *Folia Microbiol* 28: 163–171.

Rojas, O.R.; Villafaña, J.R.; González, O.R. y Nungaray, J.A. 2006. Análisis de rutas metabólicas en *Pseudomonas aeruginosa* para la producción de polihidroxicanoatos a partir de glucosa usando modos elementales. *e-Gnosis*. 4: 1-29

Rosenbrock, H.H. 1960. An automatic method for finding the greatest or least value of a function. *Computer Journal*. 3: 175-184.

Sánchez, L.; Ortiz, S. y Hernandez, A. 2003. Obtención de sideróforos a partir de *Burkholderia cepacia* y optimización del medio de cultivo para su producción. *REv. Salud Anim.* 25: 27-33.

Scott, J.R., y Bumgarner, H.R. 1965. US patent 3168796. Inoculation of legumes.

Scragg, A.H. 1997. Preparación y esterilización de medios. En: -----
Biotecnología para los ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. LIMUSA, México. pg. 263-285.

Shuler, M.L. y Kargi, F. 1992. *Bioprocess Engineering: Basics Concepts*. Prentice Hall PTR, New Jersey. pp 479

Smith R.S.; Ellis, M.A. y Smith, R.E. 1981. Effect of *Rhizobium japonicum* inoculant rates on soybean nodulation in a tropical soil. *Agron. J.* 73: 505-508.

Somasegaran, P. 1985. Inoculant production with diluted liquid cultures of *Rhizobium* spp. and autoclaved peat: Evaluation of diluents, *Rhizobium* spp., peats, sterility requirements, storage, and plant effectiveness. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 398-405.

Suárez, C.A. y Suárez, J.A. 1997. Biosíntesis y caracterización de polímeros biodegradables PHAs (Poli-β-hidroxialcanoatos) mediante bacterias del género *Pseudomonas*. Proyecto de grado Ingeniería Química. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

Sun, Z.; Ramsay, J.A; Guay, M. y Ramsay, B.A. 2005. Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 432-431.

Tang, W.H. 1994. Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. En: Ryder, M.H. Stephens, P.M. y Bowen, G.D. (Eds). *Improving Plant productivity with Rhizosphere Bacteria*. Division of Soils CSIRO, Adelaide, Australia. pg. 267-273.

Tang, W.H. y Yang, H. 1997. Research and application of biocontrol of plant diseases and PGPR in China. En: Ogoshi, A. Kobayashi, K. Homma, Y. Kodama, Kondo, F.N. y Akino, S. (Eds). *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects*. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan. pg. 4-9.

Tripathi, V.N. y Srivastava, S. 2006. Ni²⁺-uptake in *Pseudomonas putida* strain S4: a possible role of Mg²⁺-uptake pump. *J. Biosci.* 31: 61-67

Van Loon, L.C. y Bakker, P.A.HM. 2003. Signalling in rhizobacteria – plant interaction. En: De Kroon, H. y Visser, E.J.W. (Eds). Root Ecology. Springer – Verlag, Berlin. pg 297 – 330.

Votruba, J.; Pila't , P. y Prckop, A. 1975. Application of modified Rosenbrock's method for optimization of nutrient media used in microorganism culturing. *Biotechnol Bioeng* 17: 1833–1837.

White, M.D.; Glick, B.R.; y Robinson, C.W. 1995. Bacterial, Yeast, and Fungal Cultures: Effect of Microorganism Type and Culture Characteristics on Bioreactor Design and Operation. En: Asenjo, J.A. y Merchuk, J.C. (Eds). Bioreactor System Design. Marcel Dekker, New York. pp. 47-87.

Zhang, J. y Greasham, R. 1999. Chemically defined media for commercial fermentations. *51*: 407-421.

CIBERGRAFÍA

www.mcd.com.mx/pdfs/CALDO%20SOYA%20TRIPTICASEINA.pdf. Consultada
Octubre 2 de 2007.

ANEXOS

ANEXO A
DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DEL
ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)

Pasos para preparar el DNS:

- Disolver 1.6 g de NaOH grado reactivo y 30 g de Tartrato de Sodio y Potasio en 50 mL de agua destilada.
- Disolver 1 g de DNS en 30 mL de agua destilada.
- Agregar lentamente la solución del DNS a la solución de tartrato y NaOH.
- Aforar a 100 mL con H₂O destilada.
- Almacenar en frascos ámbar a la temperatura del laboratorio.

Se debe mantener un stock de glucosa 4 mg/ml y almacenarlo a 4 °C.

A partir del stock de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/L): 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 1.2.

Procedimiento:

- Preparar en cada tubo (soluciones de curva patrón, las muestras problema diluidas si es necesario y agua destilada como blanco) 0.5 mL de solución en total.
- Adicionar 0.5 mL del reactivo del DNS a cada tubo y agitar en vortex.
- Colocar las muestras en baño maría a temperatura de ebullición por 5 minutos.
- Enfriar hasta temperatura ambiente.
- Adicionar a cada tubo 5 mL de agua destilada y agitar en vortex.
- Dejar reposar los tubos por 15 min. y leer absorbancia a 540 nm.

- Realizar la curva absorbancia vs concentración. Debe tener un coeficiente de correlación de 0.991 a 0.999.

ANEXO B
DETERMINACIÓN DE SACAROSA POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO
DINITROSALICÍLICO (DNS)

La sacarosa no es un azúcar reductor y tampoco posee un extremo reductor. Sin embargo este método puede ser aplicado si la sacarosa es primero hidrolizada en solución ácida para producir glucosa y fructosa.

La curva de calibración se realiza con un stock de sacarosa (30 g/L) el cual se mantiene a 4 °C.

A partir del stock de sacarosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/L): 3, 6, 12, 18, 24 y 30.

Procedimiento:

- Preparar en cada tubo (soluciones de curva patrón, las muestras problema diluidas si es necesario y agua destilada como blanco) 100 µL de solución.
- Adicionar 200 µL de HCl 10% a cada tubo y agitar en vortex.
- Llevar a ebullición por 10 min. en baño maría precalentado a 95 °C.
- Enfriar hasta temperatura ambiente rápidamente.
- Adicionar a cada tubo 1 mL de NaOH 2.0 N y agitar los tubos en vortex
- Aparte tomar 0.5 mL de cada tubo en otros tubos rotulados y agregar 0.5 mL de DNS.
- Agitar todos los tubos en vortex.
- Colocar las muestras en baño maría a temperatura de ebullición por 5 minutos.
- Enfriar hasta temperatura ambiente.

- Adicionar a cada tubo 5 mL de agua destilada y agitar en vortex.
- Dejar reposar los tubos por 15 min. y leer absorbancia a 540 nm.
- Realizar la curva absorbancia vs concentración. Debe tener un coeficiente de correlación de 0.991 a 0.999.

ANEXO C

TINCIÓN DE GRAM

Esta tinción sirve para diferenciar las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas. Las bacterias Gram positivas mediante este método, quedan de un color azul violeta y las bacterias Gram negativas quedan de un color rojizo.

Procedimiento:

- Se toma una pequeña muestra de la bacteria a colorear y se fija a la placa.
- Se coloca la placa sobre el puente de coloración.
- Se agregan a la placa varias gotas de Cristal Violeta hasta que la muestra de bacteria quede completamente cubierta y se deja reposar por un minuto.
- Lavar la placa con agua, con la precaución de no exponer directamente el extendido.
- Agregar varias gotas de Lugol con el fin de fijar el cristal violeta y dejar reposar por un minuto
- Lavar con agua.
- Agregar Alcohol Cetona sobre la muestra y dejar reposar por 30 segundos.
- Lavar con agua.
- Agregar varias gotas de Safranina sobre la muestra y dejar reposar por un minuto.
- Lavar con agua.
- Secar la muestra.
- Observar la muestra en el microscopio.

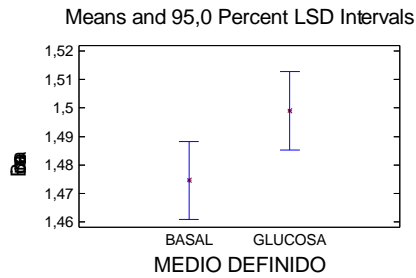
ANEXO D

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA GLUCOSA EN EL PRIMER TAMAÑO DE PASO

- Biomasa

ANOVA Table for Biomasa by MEDIO DEFINIDO

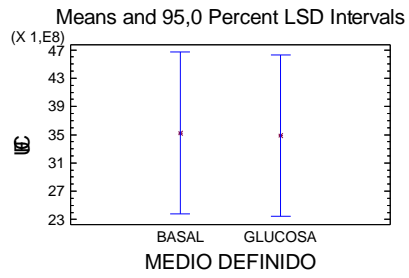
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,000597212	1	0,000597212	14,71	0,0618
Within groups	0,0000812209	2	0,0000406104		
Total (Corr.)					
	0,000678433	3			



- UFC/mL

ANOVA Table for UFC by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,6E15	1	1,6E15	0,01	0,9468
Within groups	5,645E17	2	2,8225E17		
Total (Corr.)					
	5,661E17	3			

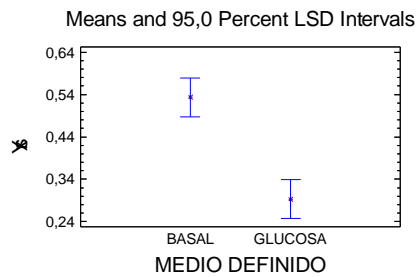


• Y'_{XS}

ANOVA Table for Yxs by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0576	1	0,0576	128,00	0,0077
Within groups	0,0009	2	0,00045		
Total (Corr.)	0,0585	3			

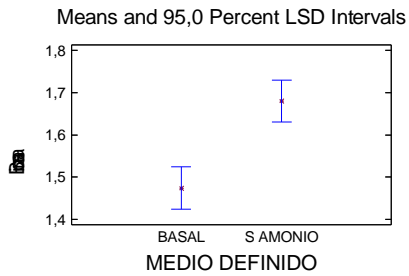


ANEXO E
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL SULFATO DE AMONIO EN EL PRIMER
TAMAÑO DE PASO

- Biomasa

ANOVA Table for Biomasa by MEDIO DEFINIDO

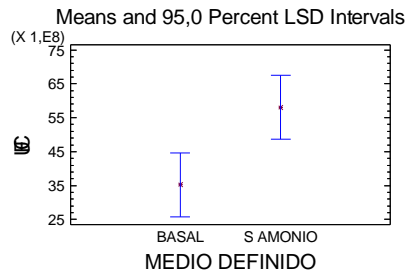
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0421393	1	0,0421393	79,82	0,0123
Within groups	0,00105587	2	0,000527936		
Total (Corr.)	0,0431952	3			



- UFC/mL

ANOVA Table for UFC by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5,1984E18	1	5,1984E18	27,18	0,0349
Within groups	3,825E17	2	1,9125E17		
Total (Corr.)	5,5809E18	3			

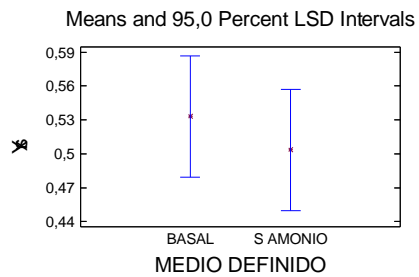


• Y'_{XS}

ANOVA Table for Yxs by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,00087025	1	0,00087025	1,40	0,3588
Within groups	0,0012465	2	0,00062325		
Total (Corr.)	0,00211675	3			



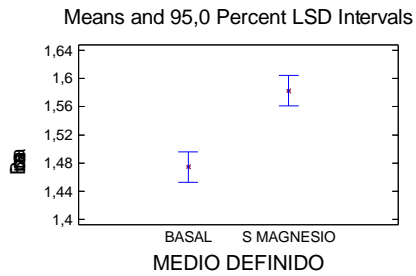
ANEXO F
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL SULFATO DE MAGNESIO EN EL PRIMER
TAMAÑO DE PASO

- Biomasa

ANOVA Table for Biomasa by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0116146	1	0,0116146	115,42	0,0086
Within groups	0,000201261	2	0,00010063		
Total (Corr.)	0,0118159	3			

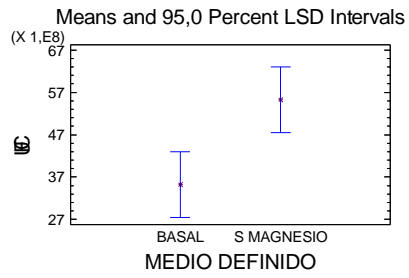


- UFC/mL

ANOVA Table for UFC by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4,02003E18	1	4,02003E18	31,01	0,0308
Within groups	2,5925E17	2	1,29625E17		
Total (Corr.)	4,27928E18	3			

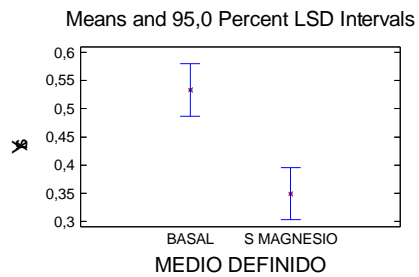


- Y'_{XS}

ANOVA Table for Y_{XS} by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0336723	1	0,0336723	73,00	0,0134
Within groups	0,0009225	2	0,00046125		
Total (Corr.)	0,0345948	3			



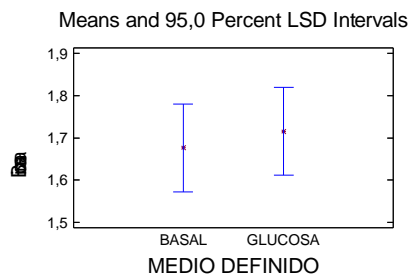
ANEXO G

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA GLUCOSA EN EL SEGUNDO TAMAÑO DE PASO

- Biomasa

ANOVA Table for Biomasa by MEDIO DEFINIDO

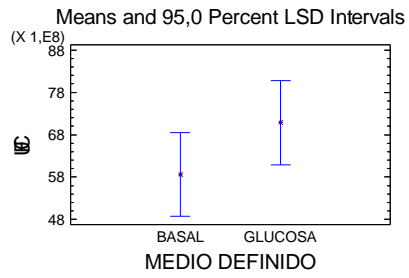
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,00152886	1	0,00152886	0,66	0,5031
Within groups	0,00466327	2	0,00233164		
Total (Corr.)	0,00619214	3			



- UFC/mL

ANOVA Table for UFC by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,50062E18	1	1,50062E18	7,09	0,1168
Within groups	4,2325E17	2	2,11625E17		
Total (Corr.)	1,92387E18	3			

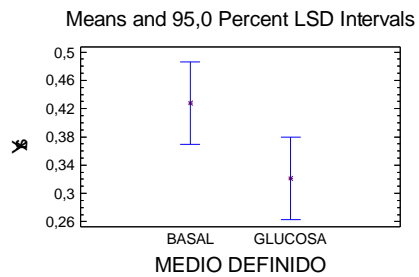


- Y'_{XS}

ANOVA Table for Yxs by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0113423	1	0,0113423	15,36	0,0594
Within groups	0,0014765	2	0,00073825		
Total (Corr.)	0,0128188	3			



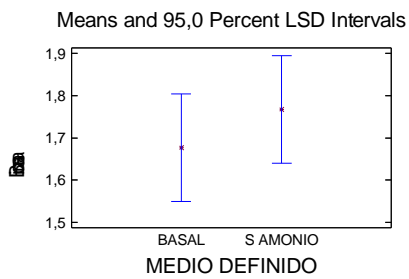
ANEXO H
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL SULFATO DE AMONIO EN EL SEGUNDO
TAMAÑO DE PASO

- Biomasa

ANOVA Table for Biomasa by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0081317	1	0,0081317	2,34	0,2658
Within groups	0,00695167	2	0,00347584		
Total (Corr.)	0,0150834	3			

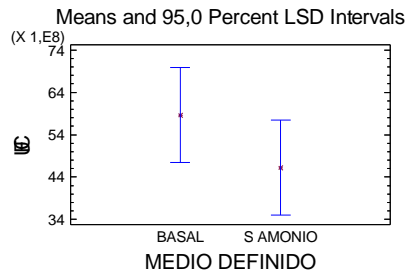


- UFC/mL

ANOVA Table for UFC by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,5376E18	1	1,5376E18	5,65	0,1405
Within groups	5,44E17	2	2,72E17		
Total (Corr.)	2,0816E18	3			

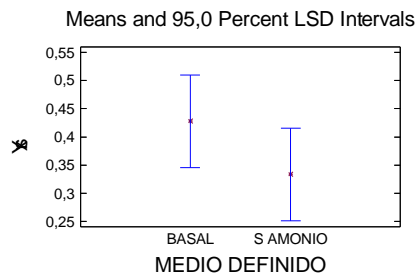


- Y'_{XS}

ANOVA Table for Y_{XS} by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,008836	1	0,008836	6,06	0,1329
Within groups	0,002917	2	0,0014585		
Total (Corr.)	0,011753	3			



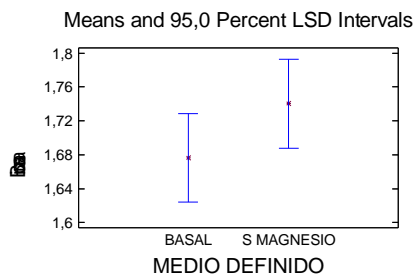
ANEXO I
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL SULFATO DE MAGNESIO EN EL SEGUNDO
TAMAÑO DE PASO

- Biomasa

ANOVA Table for Biomasa by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0040995	1	0,0040995	6,95	0,1188
Within groups	0,00118033	2	0,000590165		
Total (Corr.)	0,00527983	3			

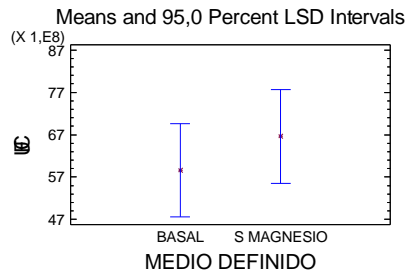


- UFC/mL

ANOVA Table for UFC by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6,4E17	1	6,4E17	2,43	0,2593
Within groups	5,266E17	2	2,633E17		
Total (Corr.)	1,1666E18	3			

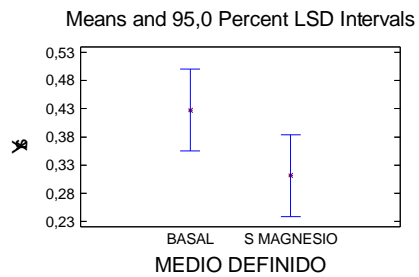


- Y'_{XS}

ANOVA Table for Y_{XS} by MEDIO DEFINIDO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,013456	1	0,013456	11,99	0,0742
Within groups	0,002245	2	0,0011225		
Total (Corr.)	0,015701	3			



ANEXO J
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA EN LA
OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DEFINIDO

Analysis Summary

Dependent variable: Biomasa

Factor: MEDIO BASAL

Number of observations: 12

Number of levels: 3

The StatAdvisor

This procedure performs a one-way analysis of variance for Biomasa. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of Biomasa for the 3 different levels of MEDIO BASAL. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

ANOVA Table for Biomasa by MEDIO BASAL

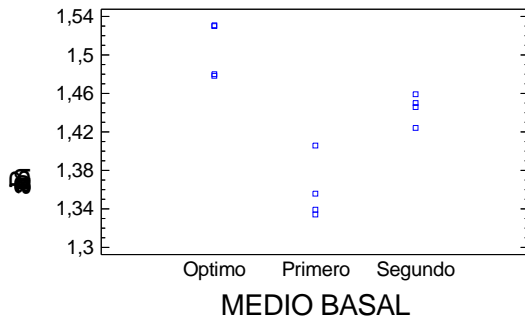
Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0430021	2	0,021501	29,88	0,0001
Within groups	0,00647717	9	0,000719685		
Total (Corr.)	0,0494793	11			

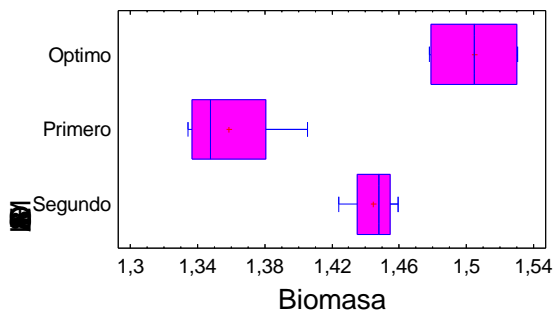
The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Biomasa into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 29,8756, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean Biomasa from one level of MEDIO BASAL to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Scatterplot by Level Code



Box-and-Whisker Plot



ANEXO K
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO EN LA
OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DEFINIDO

Analysis Summary

Dependent variable: Velocidad

Factor: MEDIO BASAL

Number of observations: 12

Number of levels: 3

The StatAdvisor

This procedure performs a one-way analysis of variance for Velocidad. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of Velocidad for the 3 different levels of MEDIO BASAL. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

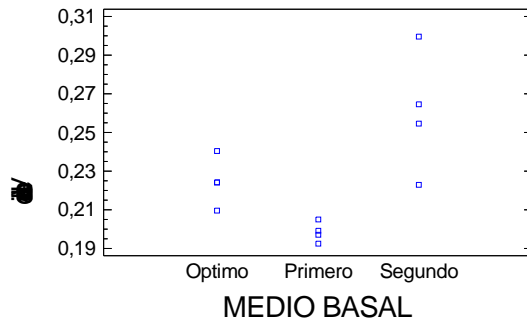
ANOVA Table for Velocidad by MEDIO BASAL

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,00773577	2	0,00386789	9,77	0,0056
Within groups	0,00356442	9	0,000396046		
Total (Corr.)	0,0113002	11			

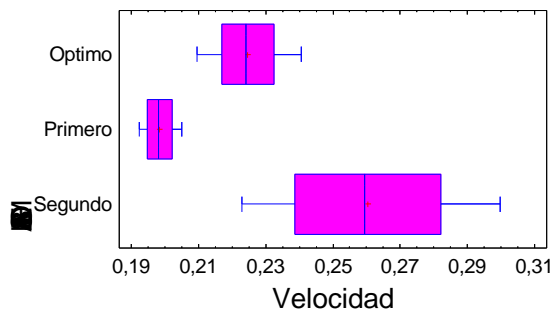
The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Velocidad into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 9,76624, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean Velocidad from one level of MEDIO BASAL to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Scatterplot by Level Code



Box-and-Whisker Plot



ANEXO L
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE UFC/mL EN LA OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE
CULTIVO DEFINIDO

Analysis Summary

Dependent variable: UFC

Factor: MEDIO BASAL

Number of observations: 6

Number of levels: 3

The StatAdvisor

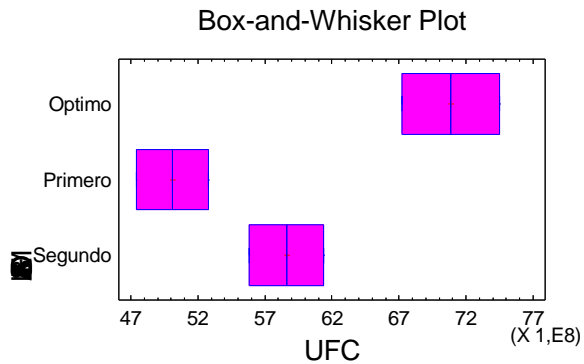
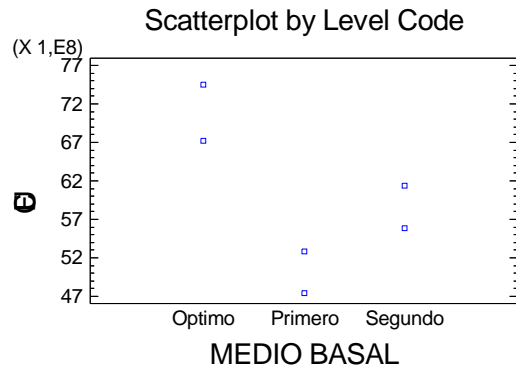
This procedure performs a one-way analysis of variance for UFC. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of UFC for the 3 different levels of MEDIO BASAL. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

ANOVA Table for UFC by MEDIO BASAL

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4,3525E18	2	2,17625E18	11,47	0,0393
Within groups	5,6905E17	3	1,89683E17		
Total (Corr.)	4,92155E18	5			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of UFC into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 11,4731, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean UFC from one level of MEDIO BASAL to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.



ANEXO M

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RENDIMIENTO DE SUSTRATO EN BIOMASA EN LA OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DEFINIDO

Analysis Summary

Dependent variable: Yxs
Factor: MEDIO BASAL

Number of observations: 12
Number of levels: 3

The StatAdvisor

This procedure performs a one-way analysis of variance for Yxs. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of Yxs for the 3 different levels of MEDIO BASAL. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

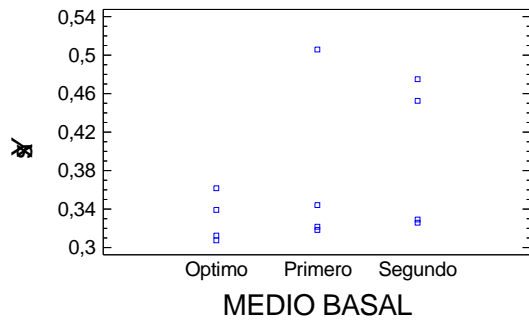
ANOVA Table for Yxs by MEDIO BASAL

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,00880855	2	0,00440427	0,88	0,4462
Within groups	0,0448528	9	0,00498364		
Total (Corr.)	0,0536613	11			

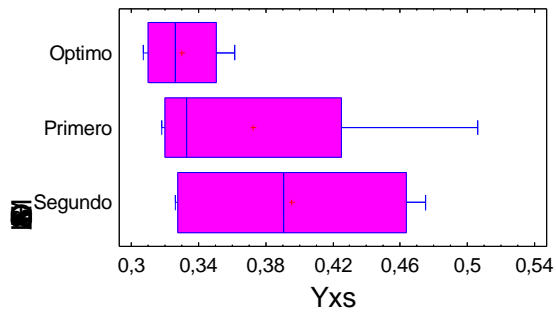
The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Yxs into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 0,883746, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0,05, there is not a statistically significant difference between the mean Yxs from one level of MEDIO BASAL to another at the 95,0% confidence level.

Scatterplot by Level Code



Box-and-Whisker Plot



ANEXO N

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA COMPARACIÓN DE LA VELOCIDAD DE
CRECIMIENTO ENTRE EL MEDIO DEFINIDO OPTIMIZADO Y EL MEDIO TSB**

Analysis Summary

Dependent variable: Velocidad

Factor: MEDIO

Number of observations: 8

Number of levels: 2

The StatAdvisor

This procedure performs a one-way analysis of variance for Velocidad. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of Velocidad for the 2 different levels of MEDIO. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

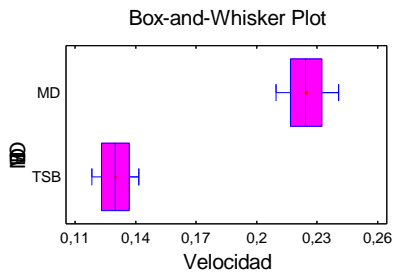
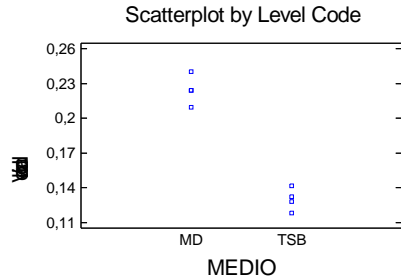
ANOVA Table for Velocidad by MEDIO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0178889	1	0,0178889	141,09	0,0000
Within groups	0,000760757	6	0,000126793		
Total (Corr.)	0,0186496	7			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Velocidad into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 141,087, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean Velocidad from one level of MEDIO to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.



ANEXO O

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA COMPARACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE
BIOMASA ENTRE EL MEDIO DEFINIDO OPTIMIZADO Y EL MEDIO TSB**

Analysis Summary

Dependent variable: Biomasa

Factor: MEDIO

Number of observations: 8

Number of levels: 2

The StatAdvisor

This procedure performs a one-way analysis of variance for Biomasa. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of Biomasa for the 2 different levels of MEDIO. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

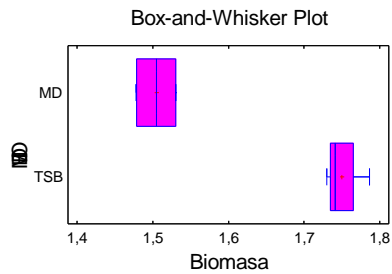
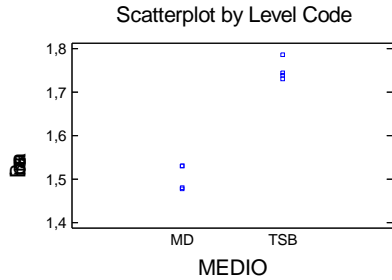
ANOVA Table for Biomasa by MEDIO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,120443	1	0,120443	159,24	0,0000
Within groups	0,00453814	6	0,000756356		
Total (Corr.)	0,124981	7			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Biomasa into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 159,241, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean Biomasa from one level of MEDIO to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.



ANEXO P
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE
SUSTRATO EN BIOMASA ENTRE EL MEDIO DEFINIDO OPTIMIZADO Y EL
MEDIO TSB

Analysis Summary

Dependent variable: Yxs
Factor: MEDIO

Number of observations: 8
Number of levels: 2

The StatAdvisor

This procedure performs a one-way analysis of variance for Yxs. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of Yxs for the 2 different levels of MEDIO. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

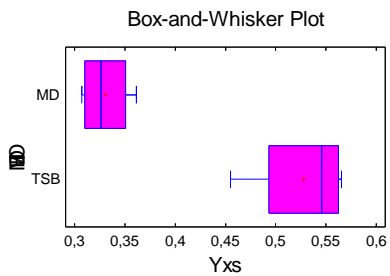
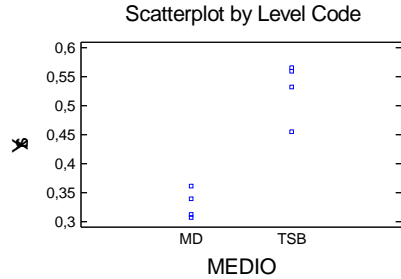
ANOVA Table for Yxs by MEDIO

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,078309	1	0,078309	48,65	0,0004
Within groups	0,0096577	6	0,00160962		
Total (Corr.)	0,0879667	7			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Yxs into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 48,6507, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean Yxs from one level of MEDIO to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.



ANEXO Q

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA COMPARACIÓN UFC/mL ENTRE EL MEDIO DEFINIDO OPTIMIZADO Y EL MEDIO TSB

Analysis Summary

Dependent variable: UFC

Factor: MEDIO

Number of observations: 4

Number of levels: 2

The StatAdvisor

This procedure performs a one-way analysis of variance for UFC. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of UFC for the 2 different levels of MEDIO. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

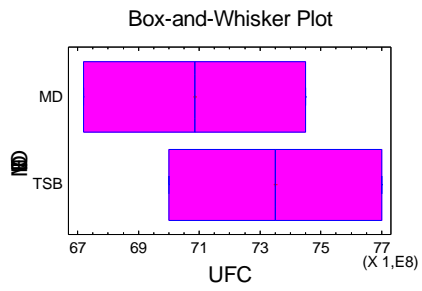
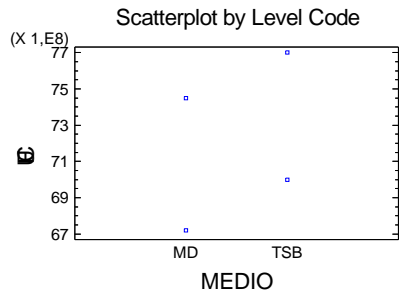
ANOVA Table for UFC by MEDIO

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	7,0225E16	1	7,0225E16	0,27	0,6525
Within groups	5,1145E17	2	2,55725E17		

Total (Corr.)	5,81675E17	3			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of UFC into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 0,274611, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0,05, there is not a statistically significant difference between the mean UFC from one level of MEDIO to another at the 95,0% confidence level.



ANEXO R
MODELO MATEMÁTICO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO
DEFINIDO OPTIMIZADO

POLYMATH Results

No Title 10-02-2007

Nonlinear regression (L-M)

Model: $X = X_0 \cdot 1.75 \cdot \exp(\mu_{\max} \cdot t) / (1.75 - X_0 + X_0 \cdot \exp(\mu_{\max} \cdot t))$

<u>Variable</u>	<u>Ini guess</u>	<u>Value</u>	<u>95% confidence</u>
X ₀	0.2	0.3520525	0.0750427
μ _{max}	0.1	0.1845496	0.0310734

Nonlinear regression settings

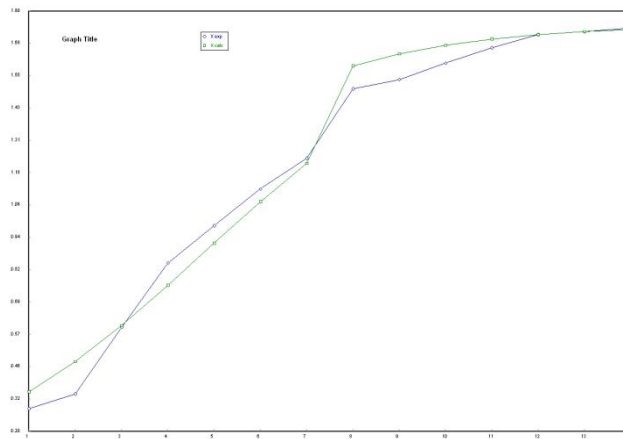
Max # iterations = 64

Precision

R² = 0.9837849
R²_{adj} = 0.9824336
Rmsd = 0.0170576
Variance = 0.0047524

General

Sample size = 14
Model vars = 2
Indep vars = 1
Iterations = 11



ANEXO S

MODELO MATEMÁTICO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO TSB

POLYMATH Results

No Title 10-02-2007

Nonlinear regression (L-M)

Model: $X = X_0 \cdot 1.9 \cdot \exp(\mu_{\max} \cdot t) / (1.9 - X_0 + X_0 \cdot \exp(\mu_{\max} \cdot t))$

<u>Variable</u>	<u>Ini guess</u>	<u>Value</u>	<u>95% confidence</u>
Xo	0.5	0.6492074	0.0992893
μ_{\max}	0.1	0.1924656	0.0367595

Nonlinear regression settings

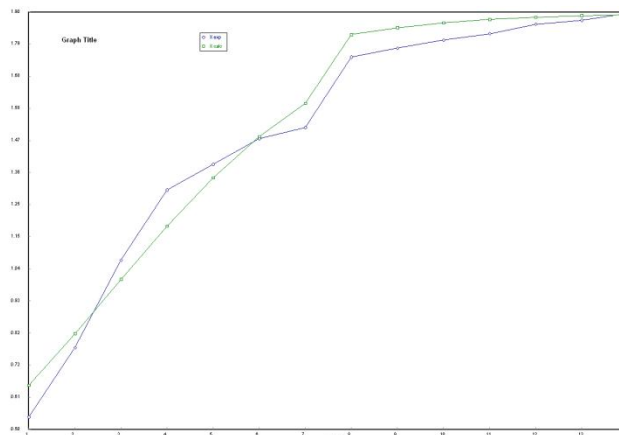
Max # iterations = 64

Precision

R² = 0.9761961
R²adj = 0.9742124
Rmsd = 0.0172348
Variance = 0.0048516

General

Sample size = 14
Model vars = 2
Indep vars = 1
Iterations = 11



ANEXO T
MODELO MATEMÁTICO DEL CONSUMO DE SUSTRATO EN EL MEDIO
DEFINIDO OPTIMIZADO

POLYMATH Results

No Title 10-03-2007

Nonlinear regression (L-M)

Model: $S = S_0 \cdot \gamma^{0.25} \cdot \left(\frac{\exp(0.1845t)}{1 - (0.25/1.75) \cdot (1 - \exp(0.1845t))} \right) - 1 - ms \cdot (1.75/0.1875) \cdot \ln(1 - (0.25/1.75) \cdot (1 - \exp(0.1845t)))$

<u>Variable</u>	<u>Ini guess</u>	<u>Value</u>	<u>95% confidence</u>
B	5	5.0487395	0.0939775
γ	0.6	0.6542966	0.2307945
ms	3.0E-04	0.0819634	0.0097392

Nonlinear regression settings

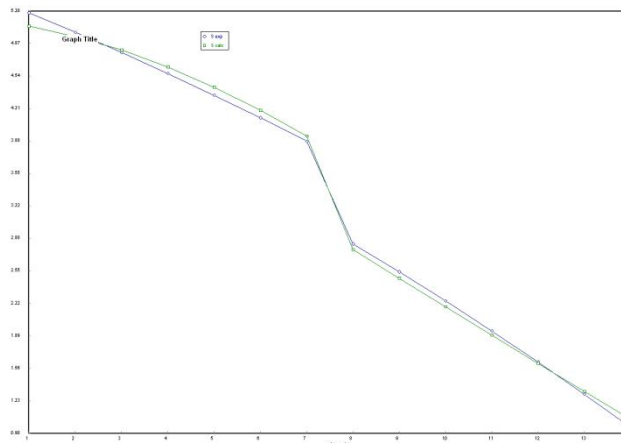
Max # iterations = 64

Precision

R² = 0.9978282
R²adj = 0.9974334
Rmsd = 0.0176748
Variance = 0.0055664

General

Sample size = 14
Model vars = 3
Indep vars = 1
Iterations = 5



ANEXO U

MODELO MATEMÁTICO DEL CONSUMO DE SUSTRATO EN EL MEDIO TSB

POLYMATH Results

No Title 10-03-2007

Nonlinear regression (L-M)

Model: $S = S_0 \cdot \gamma^{0.5} \cdot \left(\frac{\exp(0.1924 \cdot t)}{1 - (0.5/1.9) \cdot (1 - \exp(0.1924 \cdot t))} \right) - 1 - ms \cdot (1.9/0.1924) \cdot \ln(1 - (0.5/1.9) \cdot (1 - \exp(0.1924 \cdot t)))$

<u>Variable</u>	<u>Ini guess</u>	<u>Value</u>	<u>95% confidence</u>
S ₀	3.5	3.4345955	0.0496119
γ	0.6	1.0427367	0.1003773
ms	3.0E-04	0.0121959	0.0029282

Nonlinear regression settings

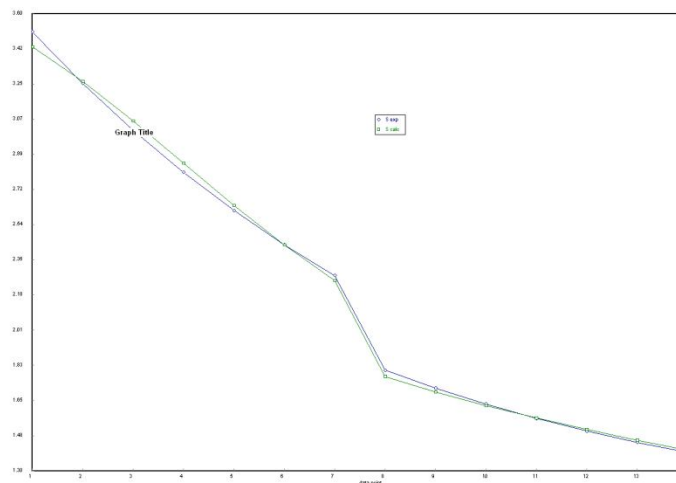
Max # iterations = 64

Precision

R² = 0.9981068
R²_{adj} = 0.9977626
Rmsd = 0.008158
Variance = 0.0011859

General

Sample size = 14
Model vars = 3
Indep vars = 1
Iterations = 5



ANEXO V

COTIZACIÓN DE REACTIVOS Y MEDIO SEMICOMPLEJO

 Filtración y Análisis	FILTRACION Y ANALISIS LTDA. NIT. 800.160.884-1 PBX: 250 75 54 FAX: 411 73 40 MEDELLIN info@filtracionyanalisis.com	COTIZACION No: 3370 FECHA: 2007/09/28 F-AV-04
SEÑOR(A): SIGIFREDO CARDENAS BEDOYA LABORATORIO DE PROCESOS UNIVERSIDAD EAFIT MEDELLIN		VALIDEZ OFERTA: 2007/10/28 FORMA DE PAGO: 30 DIAS
Con nuestro cordial saludo adjuntamos la cotización de los siguientes productos.		

REFERENCIA	DESCRIPCIÓN / OBSERVACIONES	PRESENTACION-MARCA	CANTIDAD	VR UNITARIO	% IVA	TOTAL SIN IVA	DIAS ENTREGA
433381	CALCIO CLORURO 2H2O P.A.	Kg C.ERB	1	147,000.00	16.00	147,000.00	5
A1051011000	DI-POTASIO HIDROGENOFOSFATO P	Kg MERCK	1	221,000.00	16.00	221,000.00	1
A1065801000	DI-SODIO HIDROGENOFOSFATO 2H2	Kg MERCK	1	243,000.00	16.00	243,000.00	5
346987	D(+) GLUCOSA ANHIDRA P.A.	Kg C.ERB	1	114,000.00	16.00	114,000.00	5
420777	AMONIO SULFATO P.A.	Kg C.ERB	1	78,000.00	16.00	78,000.00	5
A1027901000	COBRE(II)SULFATO 5 H2O P.A.	Kg MERCK	1	104,000.00	16.00	104,000.00	1
451877	HIERRO(II)SULFATO P.A.	Kg C.ERB	1	185,000.00	16.00	185,000.00	5
459667	MAGNESIO SULFATO 7H2O P.A.	Kg C.ERB	1	162,000.00	16.00	162,000.00	5
A1027861000	MANGANESO(II)SULFATO TETRAHID	Kg MERCK	1	448,000.00	16.00	448,000.00	45
460307	MANGANESO SULFATO 1H2O P.A. (Opcional)	Kg C.ERB	1	318,000.00	16.00	318,000.00	5
A1054580500	AGAR CASOY (TRIPTONA DE SOYA)	500 g MERCK	1	149,000.00	16.00	149,000.00	5

OBSERVACIONES:	SUBTOTAL:	2,169,000.00
El despacho de productos controlados, por el Consejo Nacional de Estupefacientes, está limitado a las condiciones legales y vigentes.	IVA:	347,040.00
Nos despedimos atentamente, esperamos su respuesta:	VALOR TOTAL:	2,516,040.00
CONSTANZA SANCHEZ RODRIGUEZ		