

Revisión bibliográfica OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS PARA MICROORGANISMOS, UNA VALIOSA ESTRATEGIA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPREPARADOS DE INTERÉS AGRÍCOLA

Gretel Gómez[✉] y C. Batista

ABSTRACT. Culture media constitute the world of microorganisms under laboratory conditions, trying to simulate their natural habitat to satisfy their most vital needs as living beings. The design of a culture medium responds to demands of the microorganism in question and to the objective pursued with its multiplication; therefore, the selection of nutrients and their appropriate concentrations is a greatly important factor. However, the employment of an appropriate methodology makes possible the obtaining of an optimum culture medium, either for growth and/or metabolite production. Numerous methods and designs of optimization exist with dissimilar characteristics, advantages and limitations that determine their use in diverse branches of investigation. The complete and fractional factorial designs, Plackett Burman, Box-Behnken and the uniform designs were approached in the work. The optimization of medium components and environmental conditions guarantees remarkable yield increments of fermentative processes in a quick and economic way. Therefore, this review seeks to approach the principles and methods of optimization, as well as characterize and exemplify the application of most used designs in culture media optimization, with the objective of extending their use to agricultural biotechnology.

RESUMEN. Los medios de cultivo constituyen el micromundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio, intentando simular su hábitat natural en relación con la satisfacción de sus más vitales necesidades como ser vivo. El diseño de un medio de cultivo responde a las exigencias del microorganismo en cuestión y a la finalidad que se persigue con su multiplicación; por tanto, la selección y la concentración adecuada de los nutrientes es un factor de vital importancia. Sin embargo, el empleo de una apropiada metodología es lo que hace posible la obtención de un medio de cultivo óptimo, ya sea para el crecimiento y/o la producción de metabolitos por parte del microorganismo. Existen numerosos métodos y diseños de optimización con disímiles características, ventajas y limitaciones que determinan su empleo en las diversas ramas de la investigación. Se abordaron en el trabajo los diseños factoriales completos y fraccionados, el Plackett Burman, el Box-Behnken y el uniforme. La optimización de los componentes del medio y de las condiciones ambientales garantiza notables incrementos en los rendimientos de los procesos fermentativos de forma rápida y económica. Por tanto, esta revisión pretende abordar los principios y métodos de optimización, así como caracterizar y ejemplificar la aplicación de los diseños más usados en la optimización de medios de cultivos, con el fin de extender su uso a la biotecnología agrícola.

Key words: optimization methods, culture medium, design, microorganisms, plant biotechnology

Palabras clave: métodos de optimización, medio de cultivo, diseño, microorganismos, biotecnología vegetal

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos necesitan de condiciones bioquímicas y biofísicas apropiadas para su desarrollo. El principal objetivo de los medios de cultivos es crear un am-

biente adecuado para el crecimiento, simulando las condiciones lo más cercanas posibles a las naturales, asegurando así el apropiado funcionamiento de la maquinaria enzimática de los microorganismos (1), lo cual implica un adecuado balance de los componentes. Teniendo en cuenta los requerimientos de cada microorganismo en particular y de los fines del investigador, se ha desarrollado una gran variedad de medios de cultivo con diferentes propósitos y usos. El éxito del diseño y la formulación de medios de cultivo para procesos

microbianos, está muy relacionado con la aplicación de conocimientos básicos acerca de los microorganismos y sustratos.

Para el desarrollo de un medio de cultivo es necesario seleccionar adecuadamente los componentes a usar. Esto incluye la selección del tipo y la concentración de los diferentes nutrientes, como son: fuente de carbono, energía, nitrógeno, fósforo, factores de crecimiento, entre otros, también de condiciones tales como concentración de oxígeno, temperatura y pH (2).

Gretel Gómez, Reserva Científica del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP. 32 700; Carlos Batista, Reserva Científica del Departamento de Microbiología, Centro de Bioproductos Marinos, Ciudad de La Habana, Cuba.

✉ gretel@inca.edu.cu

Los estudios relacionados con el diseño de nuevos medios de cultivo para la obtención de biopreparados con fines agrícolas han sido numerosos. Sin embargo, el empleo de una apropiada metodología estadística es lo que hace posible la obtención de un medio de cultivo óptimo, ya sea para el crecimiento o la producción de metabolitos por parte del microorganismo. En los procesos fermentativos microbianos, es necesaria la optimización del medio de cultivo y las condiciones ambientales, para explotar completamente el potencial de las cepas seleccionadas (3). De esta forma se garantiza que el proceso sea lo más económico y productivo posible.

Existen numerosos métodos y diseños estadísticos, que son aplicados con éxito en la optimización de sistemas en diversas áreas de la investigación, entre las que se encuentra la microbiología. No obstante, el adecuado y extensivo uso de estas herramientas estadísticas en todas las vertientes de esta rama es aún una limitación; por tanto, se pretende abordar en este material los principios y métodos de optimización, así como caracterizar y ejemplificar los diseños más usados en la optimización de medios de cultivos para microorganismos, con la finalidad de extender su empleo a la biotecnología agrícola.

MICROORGANISMOS DE INTERES AGRÍCOLA

El suelo y las raíces de las plantas permiten el desarrollo y la actividad de una amplia variedad de microorganismos, que pueden tener un notable efecto en el crecimiento y la salud de las plantas. Esta gran variedad de microorganismos han sido identificados y clasificados como perjudiciales, beneficiosos o neutrales respecto a su relación con las plantas (4). Dentro de las bacterias beneficiosas se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), las cuales tienen la capacidad de colonizar raíces y estimular el crecimiento vege-

tal. Este grupo de microorganismos ha sido ampliamente estudiado por microbiólogos y agrónomos, debido a su potencial en la producción agrícola. La actividad promotora del crecimiento ha sido informada para cepas pertenecientes a varios géneros, tales como *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia* (5); incluso algunas cepas de *Rhizobium* son consideradas como PGPR, debido a que pueden promover el crecimiento de plantas no leguminosas, como las pertenecientes a la familia *Gramineae*. La actividad promotora del crecimiento está relacionada con mecanismos tales como: la fijación biológica del nitrógeno y la capacidad de sintetizar fitohormonas o promover la nutrición mediante la solubilización de fosfatos (6). Ellas pueden también estimular el crecimiento indirectamente, protegiendo las plantas contra hongos y bacterias patógenas del suelo.

PRINCIPIOS DE OPTIMIZACIÓN

Para llevar a cabo la optimización de un proceso, desde el punto de vista de su diseño (proceso nuevo en proyecto o investigación) o explotación (proceso en planta), es indispensable seguir los pasos siguientes (7):

1. definición del problema y selección de la función objetivo
2. descripción del modelo matemático del proceso o problema
3. solución del modelo matemático mediante una técnica adecuada
4. análisis de los resultados.

La etapa 1 define la tarea de optimización. Se describe desde el punto de vista experimental el estudio de la optimización sin utilizar expresiones matemáticas junto a todas las restricciones actuantes en el proceso. De esta forma, queda definido el criterio de optimización, del cual dependerá la adecuada descripción y solución del modelo matemático a utilizar.

Como criterio de optimización se pueden tomar, en el caso de producciones microbiológicas, las concentraciones de los productos, los rendimientos, la productividad, la velocidad específica de crecimiento, entre otros, de acuerdo con el objetivo perseguido; por tanto, para que un procedimiento de optimización resulte exitoso, es imprescindible que el criterio de optimización seleccionado (función objetivo) sea representativo del resultado que se desea alcanzar.

La formulación del paso 2 no es más que la representación del objeto de la optimización en su esfera, mediante expresiones matemáticas. A menudo, el modelo matemático es conocido, aunque se dan numerosos procesos, sin investigar aún que exigen la aplicación de la modelación matemática para la definición de su modelo.

En el paso 3, según sea la naturaleza y el grado de complejidad del modelo matemático, se escoge una técnica de optimización adecuada. Es decir, aquella que conduzca al objetivo deseado con el menor gasto de recursos. En esta etapa, las computadoras constituyen una necesidad, a veces, obligada.

En el paso 4 se decide la introducción en la práctica industrial del resultado, una vez analizado y discutida su naturaleza al determinar la solución óptima del modelo matemático.

El modelo matemático es la base de todo el problema de optimización. Sin este, es imposible actuar sobre el proceso mediante alguna de las técnicas conocidas. El modelo matemático de optimización se puede obtener de dos formas (7):

- ♦ modelo analítico: se obtiene a partir de las leyes físicas y químicas de los procesos elementales
- ♦ modelo experimental: se define mediante experimentos de identificación y con el empleo del análisis de regresión. Generalmente, tienen la forma de polinomios

Existen premisas básicas para la selección de un modelo:

- ❖ *Efecto poca densidad*: el número de efectos importantes es relativamente pequeño.

- ❖ *Efecto jerarquía*: los efectos de orden inferior son más propensos a ser importantes que los de un orden superior y los efectos de un mismo orden son igualmente importantes.
- ❖ *Efecto herencia*: una interacción es más probable que sea importante si uno o más de sus factores progenitores también son importantes.

Estrategia de la optimización experimental. La estrategia a seguir en la solución de problemas de optimización experimental puede resumirse en cuatro pasos o fases (7):

- 1) se identifica un modelo de primer orden para determinar la dirección más favorable (máxima o mínima) de la búsqueda
- 2) se realizan movimientos (experimentos) según la trayectoria más favorable
- 3) cuando dejan de obtenerse buenos resultados en la dirección seleccionada, se identifica una correlación de segundo orden
- 4) se determina la solución óptima en un análisis de la correlación (superficie respuesta). En esta fase pueden usarse métodos analíticos o numéricos.

MÉTODOS DE OPTIMIZACIÓN

Existen métodos de optimización empíricos y teóricos (7). Los primeros generalmente no tienen en cuenta las relaciones que se establecen entre los parámetros a optimizar, son excesivamente laboriosos y consumen mucho tiempo, especialmente cuando se requieren optimizar muchos parámetros.

Un método empírico para la selección de la composición de un medio de cultivo, cuando no se posee la información adecuada, se puede obtener de los conocimientos básicos acerca de los requerimientos nutricionales de los microorganismos y de las características de los sustratos. La información sobre la influencia que pueden tener los elementos individuales en la biomasa y producción de metabolitos, permite

seleccionar la composición del medio de cultivo fijando las concentraciones de estos, de modo que no sean limitantes y se encuentren además en las proporciones adecuadas. Sin embargo, si ya se dispone de alguna información inicial o se ha hecho algún tipo de estudio o se cuenta con un medio basal, lo más recomendado es utilizar los métodos matemáticos de optimización aplicados para sistemas multidimensionales (con múltiples variables) y la búsqueda del óptimo en sistemas limitados o no por algún factor, los que se basan en la teoría matemática del diseño de experimentos. La búsqueda del óptimo por este tipo de procedimiento permite analizar todo el rango de concentraciones de cada componente, es decir, desde valores donde un componente dado es limitante hasta valores de máxima concentración y tienen en cuenta la influencia de todos los factores comprendidos en el criterio de optimización (8).

Cada uno de estos métodos tiene limitaciones que restringen la extensión de su uso. Los factores a tener en cuenta incluyen el número de variables que afectan la función objetivo en estudio (criterio de optimización), en la precisión con que se puede medir la función, los requisitos de precisión necesarios para un criterio de optimización dado, los sistemas de cómputo que se disponen, pero, sobre todo, el tipo de proceso en cuestión y la forma de obtener los resultados experimentales, en lo que se refiere a las variables del sistema y la función objetivo (9). Por lo tanto, la selección del método representa el paso clave de todo proceso de optimización.

Para seleccionar el método de optimización, es muy importante conocer si la información puede ser obtenida de experimentos en paralelo, o si estos tienen que ser necesariamente realizados de forma consecutiva. Este factor es muy importante particularmente en los procesos biológicos, donde frecuentemente se presenta el hecho de que las experiencias consecutivas son difícilmente reproducibles con exactitud.

Los métodos de optimización pueden ser divididos en tres grupos (7):

- ⇒ Los de búsqueda directa del óptimo. (Ej: Rosebrock y Hook-Jeeves).
- ⇒ Los métodos de gradiente que requieren del cálculo de la primera derivada de la función objetivo. (Ej.: Box y Wilson).
- ⇒ El método de Newton-Raphson que requiere del cálculo de la primera y segunda derivadas de la función objetivo.

Los métodos de búsqueda directa son las técnicas de optimización más sencillas. Sin embargo, están comprendidas entre las más eficaces. Estas suponen un comportamiento unimodal de la función objetivo y dan solo resultados aproximados, pero no exigen ninguna información acerca de la derivada de la función objetivo.

Dentro de los del grupo II se encuentran los planes compuestos centrales y rotativos, que se emplean para la adaptación de polinomios cuadráticos. Estos métodos constan de un plan 2^n (dos niveles y n factores), algunos puntos experimentales en el origen y dos puntos sobre cada una de las coordenadas, o sea, una combinación del cubo (2^n) y el octaedro. Estos planes cuadráticos se pueden utilizar al igual que el plan 3^n (tres niveles y n factores), para representar y optimizar sistemas (10).

DISEÑOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS EN LA OPTIMIZACIÓN

Hay muchos diseños que pueden ser usados para estimar los efectos de los parámetros de un proceso (factores) en las variables de salida (respuesta). La idoneidad de un diseño para una aplicación dada, está limitada por el número de experimentos en el diseño. A lo sumo, se pueden estimar los efectos de la media, $n-1$ factores y las interacciones de los factores. Por tanto, si se asume que no hay interacciones entre los factores (usualmente llamado un diseño de selección), un diseño apropiadamente concebido para ocho

experimentos pudiera estimar el efecto de siete factores en una respuesta. Sin embargo, no todos los diseños son iguales, pues hay grandes diseños que pueden estimar solo siete factores.

Los diseños factoriales completos son ampliamente usados en diversas áreas de la investigación. El diseño factorial de tres niveles y el compuesto central simple son mostrados gráficamente en las Figuras 1 y 2 respectivamente.

Una característica deseable del diseño central completo es que puede ser también un diseño ortogonal, en el cual cada una de las variables (k) del diseño puede ser evaluada independientemente; o puede ser un

diseño rotacional, en el que la varianza de la respuesta prevista es la misma para todos los puntos que están equidistantes del centro del diseño. Eso significa que si los puntos en el diseño son rotados, su distribución seguirá siendo la misma. Con el fin de lograr esta rotacionalidad, el Diseño Compuesto Central debe tener al menos un punto central replicado, y la constante $\alpha = \sqrt{\frac{k-1}{2}}$ que corresponde a los puntos axiales o estrellas (11).

De estos planes compuestos los más conocidos y empleados son los de Box: el de Box y Wilson (12) de los planes compuestos centrales, el de Box-Hunter (13) y Box-Behnken (14) de los planes compuestos rotacionales.

El diseño Box-Behnken usa una selección de caras y puntos centrales, para abarcar un espacio experimental con menos puntos que el diseño factorial completo. Este diseño es muy similar en idea al Compuesto Central, solo que difiere en que no son usados los puntos esquinas o extremos y usa solo tres niveles (15). Al igual que el método de Box-Hunter, requiere un número de experimentos significativamente más pequeño que los diseños factoriales completos. Una dificultad de los diseños factoriales es que el número de combinaciones aumenta exponencialmente con el número de factores que se quiere analizar. Por ejemplo, un diseño factorial completo con siete factores requeriría de $2^7=128$ experimentos. Sin embargo, existen los diseños factoriales fraccionados, que son mucho más pequeños que los factoriales completos y que permiten estimar independientemente los efectos principales y las interacciones entre las variables.

A pesar de que las propiedades de proyección de los diseños factoriales fraccionados son bastante bien conocidos en la literatura, las propiedades para los diseños Plackett Burman (P-B) no lo son (16).

En 1946, Plackett y Burman (17) publicaron su ahora famoso artículo «The Design of Optimal Multifactorial Experiments» en *Biometrika*. Este artículo describió la construcción de un diseño muy económico, con un número de corridas que siempre es múltiplo de cuatro. El diseño P-B en 12 ensayos, por ejemplo, puede ser usado para un experimento que contiene hasta 11 factores. Estos son conocidos como *diseños de efecto principal saturados*, porque todos los grados de libertad son utilizados para estimar los efectos principales. Este diseño es muy eficaz en los experimentos de selección, ya que detecta un gran número de efectos principales de forma económica, asumiendo que todas las interacciones son insignificantes comparadas con los efectos principales.

El diseño factorial de De Meo (18) es una valiosa herramienta para la

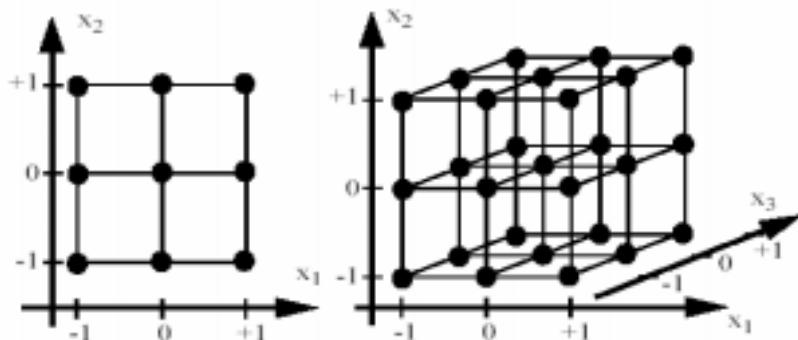


Figura 1. Representación del diseño de tres niveles (a) analizando dos factores ($k=2$): X_1, X_2 (b) analizando tres factores ($k=3$): X_1, X_2, X_3 . Los valores de +1, 0, -1 corresponden a los niveles alto, centro y bajo respectivamente

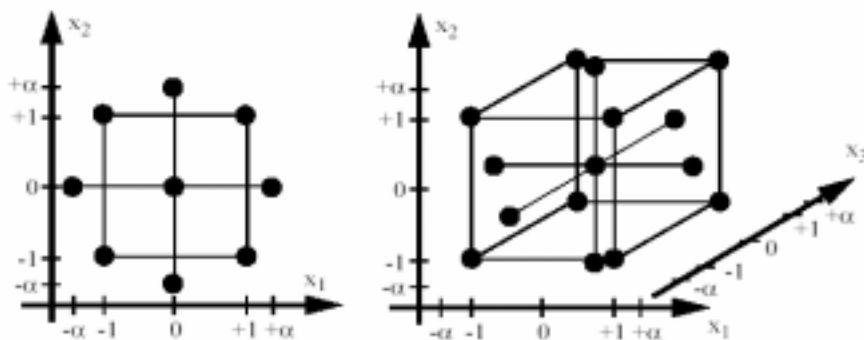


Figura 2. Representación del diseño compuesto central (a) analizando dos factores ($k=2$): X_1, X_2 (b) analizando tres factores ($k=3$): X_1, X_2, X_3 . Los valores de +1, 0, -1 corresponden a los niveles alto, centro y bajo respectivamente y los puntos $+\alpha$ y $-\alpha$ corresponden a los puntos axiales o estrellas

rápida evaluación de los efectos de diferentes constituyentes en el medio de cultivo. Este es similar al diseño Plackett-Burman, solo que en un diseño de ocho corridas todas las variables se mantienen en un nivel alto en vez de uno bajo y no utiliza variables confundidas (19).

Los diseños factoriales fraccionados, el P-B y el de De Meo no constituyen métodos de optimización, pues si bien prueban dos niveles de cada uno de los componentes del medio de cultivo, no son capaces de determinar la cantidad exacta requerida de cada constituyente. Sin embargo, sí indican de manera confiable la importancia de cada elemento en el medio de cultivo y de cómo pueden afectar en el crecimiento y la formación de productos. Por tanto, constituyen herramientas auxiliares muy valiosas para la optimización de medios de cultivos.

La metodología de superficie respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas usadas para el estudio de las relaciones empíricas entre una o más respuestas que son medidas y el diseño de variables o factores que las crearon. Estos métodos estadísticos, que consisten en un cuidadoso diseño de experimentos y el análisis de los subsiguientes datos, fueron introducidos, primero por Box y Wilson (12), más tarde desarrollados por Box y Hunter (13) y por muchos otros (11). Generalmente, las relaciones determinísticas que gobiernan el comportamiento de las respuestas para el conjunto de variables es tan complejo como desconocido. Por consiguiente, las aproximaciones en forma de modelos empíricos son necesarias para determinar estas leyes. Estos criterios son la base de la MSR. Los diseños factoriales fraccionados y completos pertenecen a la metodología de superficie de respuesta, que permite el ensayo de procesos de múltiples variables independientes en un solo experimento. El diseño puede tratar con diversos factores, con dos niveles o más. Puede ser exitoso aplicado a la optimización de medios de cultivo en muchos procesos fermentativos, para

la producción de metabolitos primarios y secundarios (20).

En la Tabla I se describen algunos tipos de diseños, los cuales son clasificados en métodos de selección o de optimización (21); sin embargo, todos están concebidos dentro de la metodología de superficie respuesta. En cuanto a los estudios de las interacciones, el diseño factorial permite estudiar todas las interacciones entre los factores, mientras que los demás evalúan solo las seleccionadas por el investigador.

El diseño uniforme fue propuesto por primera vez por Fang (22). Desde entonces han sido consistentemente referidos numerosos ejemplos de aplicaciones exitosas de este método en el mejoramiento de tecnologías en varios campos. El diseño uniforme tiene dos características:

1. la incidencia de cada nivel de cada factor en los experimentos es solamente una
2. el número de ensayos experimentales iguala el nivel del número de factores.

La ventaja del método de diseño uniforme es que el número de experimentos es considerablemente menor que el requerido por otras técnicas de diseños experimentales conocidas (23).

Una comparación entre diferentes diseños experimentales es mostrada en la Tabla II. Puede apreciarse claramente que el diseño uniforme tiene la menor cantidad de experimentos con el mayor número de niveles de factores, reduciendo el costo y tiempo de los experimentos.

APLICACIÓN DE MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son tradicionalmente optimizados por el método "un factor a la vez", o sea, variando un factor mientras los otros se mantienen en un nivel constante (24, 25). El método es simple y fácil, sin la necesidad de complejos análisis estadísticos, pero involucra un número de experimentos relativamente grande y la interacción entre los factores es frecuentemente ignorada. Por tanto, este método no es capaz de garantizar completamente la determinación de las condiciones óptimas. En contraste, el diseño factorial o un método de plan ortogonal son muy convenientes, ya que pueden ser capaces de estudiar estas relaciones y mejorar los rendimientos en los procesos.

A continuación presentamos algunos ejemplos de la variedad de situaciones en que pueden ser empleados los métodos de optimización.

El crecimiento y la producción de carotenoides por el mutante 32 de *Rhodotorula glutinis* fue optimizado en frascos agitados, mediante un diseño factorial con dos niveles y tres variables (glucosa, extracto de levadura y treonina). La optimización del medio resultó en un incremento de la producción volumétrica en cuatro veces y en dos veces de la acumulación celular de carotenoides, alcanzando valores de $129 \pm 2 \text{ mg.L}^{-1}$ (26).

Tabla I. Principales usos de algunos diseños estadísticos

Tipo de diseño	Método de selección	Método de optimización	Superficie respuesta	Estudios de interacción
Box-Behnken	No	Sí	Sí	Seleccionados
Compuesto central	No	Sí	Sí	Seleccionados
Factorial	Sí	Sí	Sí	Todos
Factorial fraccionado	Sí	No	Sí	Seleccionados
Plackett Burman	Sí	No	Sí	Seleccionados

Tabla II. Comparación de algunos diseños mencionados en el documento

	Diseño factorial completo	Diseño ortogonal	Diseño superficie respuesta	Diseño uniforme
Número factores	3	3	3	3
Número niveles	6	3	5	6
Número experimentos	216	9	20	6, 8, 10...

La metodología de superficie respuesta fue usada para evaluar el efecto de las variables: concentración de glucosa, pectina, extracto de torta de soya, caseína, harina de maíz, sulfato de amonio, bicarbonato de sodio y el pH inicial en el medio. Se empleó un diseño factorial fraccionado, para evaluar los factores que influían en el crecimiento de la cepa probiótica *Clostridium butyricum* y el diseño compuesto central, con el fin de obtener el modelo estadístico de optimización del medio de fermentación. Después de 24h de fermentación en el medio optimizado, la población de microorganismos viables alcanzó valores de 10^9 UFC. mL⁻¹, obteniéndose incrementos en los rendimientos al usar este diseño estadístico (27).

Lee, Chen y Chou (20) optimizaron un medio de cultivo para la producción de la enzima colesterol oxidasa por *Rhodococcus equi* no. 23, usando un diseño compuesto central y la metodología de superficie de respuesta. Los resultados revelaron que el colesterol y el extracto de levadura tienen un efecto positivo en la producción de la colesterol oxidasa. El pico de producción de esta enzima (0.242 U.mL⁻¹) después de 60-72 horas de cultivo fue aproximadamente cuatro veces mayor que en el medio control.

La optimización del medio de fermentación para un máximo en la producción de proteasa alcalina se realizó con una nueva cepa, *Bacillus* sp. PE-11. La fuente de carbono (glucosa), la fuente de nitrógeno (peptona) y la solución salina fueron seleccionadas para optimizar. Fue usado un diseño factorial completo 2³ y la metodología de superficie de respuesta para el diseño de los experimentos y análisis de los resultados. Este procedimiento redujo el número de experimentos realizados, además de concebir las posibles interacciones entre los tres componentes. Los valores óptimos para las variables probadas para tener un máximo en la producción de proteasa alcalina fueron: glucosa 7.798 (g.L⁻¹), peptona 9.548 (g.L⁻¹) y solución salina 8.757 %.

Este método fue eficiente; solo fueron necesarios 20 experimentos para evaluar estas condiciones y la suficiencia del modelo fue satisfactoria, pues el coeficiente de determinación fue 0.941. Se demostró que el uso del diseño central compuesto para inducir un alto rendimiento en la producción de una enzima resultó ser eficiente. De manera que diseños experimentales pequeños y menos consumidores de tiempo podrían ser suficientes para la optimización de muchas fermentaciones (28).

Un diseño factorial fraccionado 2⁵⁻¹ fue empleado para investigar el efecto de los componentes del medio en la producción de lisozima de clara de huevo de gallina por *Aspergillus niger* HEWL WT-13-16. Se evidenció que el almidón, la peptona y el sulfato de amonio fueron los factores significativos en la producción de esta enzima, mientras que los demás factores no resultaron ser significativos en los niveles evaluados. El método de máximo ascenso fue usado para aproximarse a las inmediaciones del óptimo, seguido de un diseño central compuesto para desarrollar una superficie respuesta y optimizar el medio. La composición óptima para la producción de lisozima fue en g.L⁻¹, 34 de almidón, 34 de peptona, 11.9 de sulfato de amonio, 0.5 de extracto de levadura y 0.5 de CaCl₂ · 2H₂O. Este medio fue concebido para producir teóricamente, 212 mg.L⁻¹ de lisozima, y se verificó una concentración máxima experimental de 209 ± 18 mg.L⁻¹ (29).

La optimización de los componentes del medio de fermentación para la producción de xilanas por *Aspergillus versicolor* MKU3 se realizó usando el diseño factorial fraccionado De Meo (18). Los valores óptimos encontrados para los siete componentes del medio incrementaron la producción de xilanas de tres a cuatro veces en fermentación en estado sólido (19).

Se ha informado (30) la producción por *Collybia maculata* de una concentración máxima de exopolisacáridos EPSs de 2.4 g.L⁻¹, luego de optimizar

las condiciones para el cultivo sumergido en un reactor de 5 L. Ese valor fue aproximadamente cinco veces superior al informado para el medio basal. La concentración óptima de los componentes del medio se determinó con un método de matriz ortogonal, obteniendo la siguiente formulación: 30 g.L⁻¹ de glucosa, 20 g.L⁻¹ de Martona A-1, 1 g.L⁻¹ de K₂HPO₄ y 1 g.L⁻¹ de CaCl₂.

Un incremento de 3.5 veces en la producción de queratinasa por *Bacillus licheniformis* RG1 fue lograda combinando el diseño Plackett–Burman y la metodología de superficie de respuesta. Ocho variables fueron evaluadas usando el diseño Plackett–Burman. Un óptimo en la producción de queratinasa de 1295 U.mg⁻¹ de peso seco se obtuvo con la siguiente composición del medio: 10 g.L⁻¹ de glucosa, 10 de peptona, 10 de fosfato, 0.5 de glutatona, 5 de plumas y 2 % de inóculo, bajo agitación de 250 rpm con un período de incubación de 72 h a 37°C (31).

También se ha informado (32) la exitosa implantación del diseño multifactorial Plackett–Burman, para la selección de los componentes limitantes del crecimiento y el subsiguiente uso de la metodología de superficie respuesta, para formular un medio que sustente el crecimiento exponencial de la morfología agregada de la bacteria *Teredinobacter tumirae*.

La optimización de las condiciones del cultivo sumergido para el crecimiento del micelio y la producción de exo-biopolímero por *Auricularia polytricha* se realizó en dos etapas. Con el método “un-factor-a-la-vez”, los factores ambientales (pH inicial y temperatura) y los componentes del medio (carbono, nitrógeno y fuentes minerales) fueron evaluados. La sacarosa, el extracto de levadura y el K₂HPO₄ se identificaron como las fuentes de C, N y minerales más adecuadas y fueron optimizadas con el Diseño Uniforme. Las concentraciones óptimas propuestas fueron: sacarosa 6 % (w/v), extracto de levadura 2.5 % (w/v) y K₂HPO₄ 0.3 % (w/v) para el crecimiento micelial, mientras que para la producción de

exo-biopolímero solo varió la concentración de extracto de levadura, con un valor de 1.28 % (w/v). La eficiencia de dichos métodos fue confirmada con los incrementos obtenidos para estas dos variables (33).

El Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR) cuenta con un producto denominado BIOIL-FC formado por cinco bacterias aisladas de la plataforma insular y que ha sido utilizado con resultados satisfactorios en la mitigación de derrames de petróleo. El empleo del Diseño Rotacional Central Compuesto (13) permitió optimizar la producción de biomasa de las cepas. Como se aprecia (Tabla III), en todos los casos aumentan los valores de la función objetivo de forma significativa, lo que evidencia un proceso más eficiente y económico para la obtención de la biomasa necesaria, para mitigar la contaminación por hidrocarburos en suelos.

Tabla III. Porcentaje del aumento de la producción de biomasa para cinco cepas de *Bacillus degradadoras del petróleo*

Cepa	Aumento (%)
CBM-60	20
CBM-225	28
CBM-226	24
CBM-232	35
CBM-234	31

Con el empleo de este mismo diseño, se aumentó la producción de tensoactivos por la cepa *Bacillus licheniformes* CBM-60 (integrante del BIOIL-FC) en un 73 %, luego de ser optimizado el medio de cultivo (9).

Con el diseño experimental Plackett-Burman (17), se evaluó la influencia de ocho nutrientes en la producción de enzimas pectinasas por *Actinomyces naeslundii*, empleando dos niveles de variación para cada uno de los factores: cáscara de naranja, sulfato de amonio, urea, sulfato ferroso, cloruro de calcio, cloruro de sodio, sulfato de magnesio y carbonato de sodio. La optimización del medio de cultivo experimental se llevó a cabo con el diseño de Box-Behnken. Las concentraciones ópti-

mas de los factores significativos para obtener una máxima producción de enzimas fueron: 16,7g.L⁻¹ de cáscara de naranja, 5 g.L⁻¹ de sulfato de amonio y 0.013g.L⁻¹ de sulfato ferroso (33).

Las condiciones de cultivo para la producción de celulosa bacteriana por *A. xylinum* BPR2001 en un fermentador de 10 L fueron optimizadas con el diseño Box-Behnken. La metodología de superficie respuesta fue usada para predecir los niveles de los factores (fructosa, licor de maíz, oxígeno disuelto, y concentración de agar). Los valores óptimos encontrados para estas variables mejoraron la producción y el rendimiento de la celulosa bacteriana en un 76 y 57 % respectivamente (34).

Se empleó el diseño experimental Box-Behnken (14) para investigar el efecto de cinco factores en la concentración de biomasa y lovastatina producida en el cultivo por lote de *Aspergillus terreus*. El diseño pudo identificar que el contenido de oxígeno en la fase gaseosa resultó ser el factor de mayor influencia en la producción de lovastatina. Un medio que contiene en g.L⁻¹: 48 de lactosa, 0.46 de harina de soya y 0.79 de KH₂PO₄ mostró notables valores en la producción de lovastatina (230 mg.L⁻¹), luego de siete días de fermentación en condiciones ricas de oxígeno (80 % v/v de oxígeno en el gas de aeración). Las condiciones de fermentación optimizadas elevaron los títulos de producción cuatro veces, en comparación con la peor de las combinaciones estudiadas (15).

Se estudió a nivel de laboratorio la influencia de Sirope-fructuosa y de Peptona en la producción de sideróforos a partir de *Burkholderia cepacia* mediante un diseño factorial de dos niveles. La cantidad de Peptona se varió de 15-25 g.L⁻¹ y la cantidad de Sirope-fructuosa de 3-3.4 mL. Se obtuvo que las variables, cantidad de Sirope-fructuosa así como la interacción entre Sirope-fructuosa y Peptona, influyen significativamente en la producción de sideróforos. En la región evaluada, los mejores resultados en cuanto a la producción

del metabolito secundario fueron obtenidos a concentraciones de Sirope-fructuosa de 13,4 mL y de peptona de 10 g.L⁻¹ (35).

La utilización de las técnicas de optimización resultó ser efectiva en todas las situaciones expuestas anteriormente, pues se muestran incrementos en las funciones objetivos.

CONSIDERACIONES FINALES

Teniendo en cuenta la bibliografía consultada, se puede concluir que el éxito de la optimización de un proceso depende de la selección de la función objetivo, del número de factores estudiados y experimentos necesarios para alcanzar el objetivo, sin gastos indebidos de tiempo y recursos. El empleo de estos métodos no requiere de reglas predeterminadas, pues todos los diseños tienen características peculiares, que determinan su empleo en diversas situaciones y ninguno debe soslayarse, incluso puede emplearse más de un diseño, de forma complementaria.

En situaciones tan disímiles, como las expuestas anteriormente, la selección de una adecuada técnica de optimización garantizó incrementos en todas las variables respuestas, demostrando la efectividad de estas herramientas estadísticas en la optimización de medios para microorganismos, lo que sugiere una extensión de la aplicación de estos métodos en el desarrollo de nuevos medios de cultivo para microorganismos de interés agrícola.

REFERENCIAS

1. Todar, K. Nutrition and growth of bacteria. [Consultado 30-11-2003]. Disponible en: <http://www.bact.wisc.edu/Bact303/NutritionandGrowth>.
2. Núñez, R. Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. [Tesis de doctorado], UH, 2003.

3. Parekh, S.; Vinci, V. A. y Strobel, R. J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, vol. 54, p. 287-301.
4. Somers, E. y Vanderleyden, J. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews of Microbiology*, 2004, vol. 30, p. 205-240.
5. Hurek, T. y Reinhold-Hurek, B. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol*, 2003, vol. 106, p. 169.
6. Persello-Cartieaux, F.; Nussaume, L. y Robaglia, C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ*, 2003, vol. 26, p. 189.
7. Boizán, M. A. *Optimización*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1988.
8. Pilat, P. /et al./ Application of mathematical optimization methods in microbiology. *Folia Microbiol*, 1976, vol. 21, p.391-406.
9. Batista, C. Optimización de la producción de tensoactivo a partir de una cepa marina. [Tesis de Diploma]; ISPJAE, 2003.
10. López, R. *Diseño estadístico de Experimentos*. La Habana: Edit. Científico-técnica. 1988
11. Tai, J.; Mavris, D. y Schrage, D. Application of a response surface method to the design of tipjet driven stopped rotor/wing concepts. 1st American Institute of Aeronautics and Astronautics (AIAA) Aircraft Engineering, Technology, and Operations Congress, Los Angeles, 1995, September 19-21.
12. Box, G. E. P. y Wilson, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of Royal Statistical Society*, B13, 1-38, Discussion 38-45, 1951.
13. Box, G. E. P.; Hunter, W. G. y Hunter, J. S. *Statistics for Experimenters: An introduction to design, data analysis, and model building*, New York: John Wiley & Sons, 1978.
14. Box, G. E. P. y Behnken, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 1960, vol 2, p. 455-475.
15. Casas, J. L. /et al./ Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004, vol. 79, p.1119-1126.
16. Lin, D. y Draper, N. Projection properties of Plackett and Burman designs. *Technometrics*, 1992, vol. 34, no. 4, p. 423-428.
17. Plackett, R. L. y Burman, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 1946, vol. 33, no. 4, p. 305-325.
18. Meo, M. de /et al./ Application des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et des conditions de culture en fermentation. *Biosciences*, 1985, vol. 4, p. 99-102.
19. Jeya, M.; Thiagarajan, S. y Gunasekaran, P. Improvement of xylanase production in solid-state fermentation by alkali tolerant *Aspergillus versicolor* MKU3. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, vol. 41, no. 2, p. 175-178.
20. Lee, T. M.; Chen, W. C. y Chou, C. C. Maximization of cholesterol oxidase production by *Rhodococcusequi* no. 23 by using response surface methodology Biotechnol. *Appl. Biochem*. 1998, vol. 28, p. 229-233.
21. Prvan, T. y Street, D. An annotated bibliography of application papers using certain classes of fractional factorial and related designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 2002, vol. 106, p. 245-269.
22. Fang, K. T. Experimental design by uniform distribution. *Acta Mathematicae Applicatae Sinica*, 1980, vol. 3, p. 363-372.
23. Xu, C. P. Y, Yu, J. W. Optimization of submerged-culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Auricularia polytricha* (wood ears fungus) using the methods of uniform design and regression analysis. *Biotechnol Appl. Biochem*, 2003, vol. 38, p. 193-199.
24. Park, J. P. /et al./ Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, vol. 33, p. 76-81.
25. Kim, S. W. /et al./ Influence of nutritional conditions on mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, vol. 34, p. 389-393.
26. Bhosale, P. y Gadre, R. V. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, vol. 33, p. 12-16.
27. He, G. Q.; Kong, Q. y Ding, L. X. Response surface methodology for optimizing the fermentation medium of *Clostridium butyricum*. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, vol. 39, no. 4, p. 363-368.
28. Adinarayana, K. y Ellaiah, P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus*. *J. Pharm Pharmaceut Sci.*, 2002, vol. 5, no. 3, p. 272-278.
29. Gheshlaghi, R. /et al./ Medium optimization for hen egg white lysozyme production by recombinant *Aspergillus niger* using statistical methods. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, vol. 90, no. 6, p. 754-760.
30. Jong Min Lim /et al./ Optimization of medium by orthogonal matrix method for submerged mycelial culture and exopolysaccharide production in *Collybia maculata*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, vol. 119, no. 2, p. 159-170.
31. Ramnani, P. y Gupta, R. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 2004, vol. 40, p. 191-196.
32. Ahuja, S. K.; Ferreira, G. M. y Moreira, A. R. Application of Plackett-Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth for aggregated shipworm bacterium. *Biotechnol Bioeng*, 2004, vol. 85, no.6, p. 666-675.
33. Orbegoso, A. y Germán, A. Producción de enzimas pectinasas por Actinomycetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja. [Tesis de Maestría en Biotecnología], Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2002.
34. Bae, S. y Shoda, M. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnken design. *Biotechnol Bioeng*, 2005, vol.90, no.1, p.20-28.
35. Sánchez, L. Ortiz, S y Hernández, A. Obtención de sideróforos a partir de *Burkholderia cepacia* y optimización del medio de cultivo para su producción. *Rev. Salud Anim*, 2003, vol. 25, no. 1, p. 27-33.

Recibido: 30 de enero de 2006

Aceptado: 17 de octubre de 2006