

Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*

Exploratory analysis for the optimization of culture media for *Bacillus thuringiensis* fermentation

Jenny M. Escobar*, E. Milena Pardo*, Gustavo Buitrago*, Luis A. López**

RESUMEN

Los insecticidas químicos usados indiscriminadamente traen riesgos para la salud de quienes los aplican y de quienes consumen alimentos contaminados con éstos; además atacan insectos benéficos, aves, peces y mamíferos. Como alternativa al uso de insecticidas químicos están los bioinsecticidas, como es el caso de *Bacillus thuringiensis*, que es específico para el insecto plaga que se desea controlar. Un factor clave en la producción por fermentación de biopesticidas basados en *Bacillus thuringiensis* es el diseño del medio de cultivo, el cual debe ser económico y contener todos los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo. Del cultivo se espera que rinda una alta producción de ingrediente activo conformado por los cristales que contienen las toxinas y por la espora del microorganismo, y que este ingrediente posea el valor de toxicidad requerido para la formulación del producto comercial. En este trabajo se estudiaron diferentes medios de cultivo, se seleccionó un medio promisorio y se optimizó para la fermentación con una cepa nativa de *B. thuringiensis* teniendo en cuenta no sólo el ingrediente activo sino también los costos que éste genera en materias primas. Se lograron concentraciones finales de ingrediente activo entre 15 y 16 g/L con un costo aproximado por materias primas de \$650/kg producto (aproximadamente US\$0,30/kg producto). Para esto se utilizó la metodología de superficies de respuesta en un diseño compuesto central (DCC) para la fase de experimentación, y para la fase de optimización se utilizó el método desarrollado por Derringer y Suich (1980) para múltiples respuestas.

Palabras clave: biopesticidas, medios de cultivo, superficie de respuesta, respuesta dual, gráficas de contorno, diseño compuesto central.

ABSTRACT

Agrichemical involve health risks for producers and consumers; they can also affect beneficial insects, birds, fish and mammals. *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides specific for insect plagues are available, which, represent an alternative to traditional chemically-based products. Culture media design is an important factor in the production of biopesticides based on *Bacillus thuringiensis*. The media have to be economical and they must contain all the nutrition factors required by the bacteria. The yield of active ingredient, comprising the toxin-containing crystal protein and bacterial spores, must be high and with adequate toxicity to formulate the biopesticide. In this work we studied different culture media and optimised a promising culture medium for *B. thuringiensis* fermentation to obtain an active ingredient for use as raw material in manufacturing a biopesticide. The final concentration of active ingredient was 15 to 16 g/L and the raw material cost around US \$0,30/kg product. Calculations for the experimental phase were done using the res-

* Ingenieros químicos. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Grupo de Biopesticidas. Correo electrónico: gbuitragoh@unal.edu.co

** Estadístico, Ph. D. Estadística. Profesor asociado, Departamento de Estadística, Universidad Nacional de Colombia.

Recibido: septiembre 3 de 2003. **Aceptado:** julio 30 de 2004.

ponse surface technique in a central composite design (CCD), the optimisation phase used Derringer and Suich (1980) method for dual response.

Key words: Biopesticidas, culture media, surface response, dual response, contour plots, central composite design.

INTRODUCCIÓN

El 15% de las pérdidas mundiales en agricultura se debe al ataque de insectos, por esta razón, el productor agrícola se ve obligado a invertir en el control de plagas, aumentando los costos de producción. Los insecticidas químicos pueden generar resistencia en los insectos, obligando a aumentar las dosis e incrementando los costos. Adicionalmente, generan desequilibrio en el ambiente. El uso de biopesticidas es una alternativa económica al tratamiento con insecticidas químicos, cada vez más difundida en el sector agrícola en razón de la necesidad de producir bajo criterios de sostenibilidad ambiental.

Las características del ingrediente activo determinan en gran medida la economía del proceso, por esta razón la optimización de la fermentación toma como variables respuesta la cantidad y calidad del ingrediente activo producido, las cuales dependen del medio y condiciones de cultivo empleados. Este trabajo desarrolla una estrategia para optimizar la producción de ingrediente activo en cultivos con una cepa nativa de *B. thuringiensis*, recurriendo a una herramienta estadística para la validación y el análisis de los datos generados.

Muchos autores han estudiado medios de cultivo para *B. thuringiensis* (Smith, 1982; Arcas *et al.*, 1984; Avignone y Arcas, 1992; Pearson y Ward, 1988). Uno de los artículos más relacionados con el presente trabajo fue el desarrollado por Liu y Tzeng (1998), quienes buscaban encontrar las concentraciones de almidón, harina de pescado, CaCO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que produjeran la mayor concentración de esporas, utilizando la metodología de superficies de respuesta para una sola respuesta. Sin embargo, Liu y Tzeng maximizaron el número de esporas viables sin tener en cuenta los costos que el medio generaba; en este trabajo los objetivos contemplaron, además de obtener concentraciones altas de ingrediente activo, también obtener un producto económico, es decir, se buscó maximizar el peso seco y minimizar los costos. Los costos trabajados corresponden sólo a los de materias primas sin incluir los costos de producción.

En el presente trabajo se estudiaron y evaluaron medios de cultivo reportados en la literatura (tabla 1),

a partir de estos resultados se seleccionó para optimizar aquel que produjo las mayores concentraciones de ingrediente activo medido como peso seco (espora y cristal paraesporal). De los medios de cultivo evaluados, el propuesto por Galán (1993) produjo los mejores resultados. Éste utiliza melaza, harina de soya, jarabe de maíz y CaCO_3 .

Para la experimentación se aplicó el diseño compuesto central que está enmarcado en la metodología de superficie de respuesta, dado que dentro del marco de la optimización de medios de cultivo, y en general de productos o procesos, es una de las técnicas más empleadas para desarrollar y formular nuevos productos y mejorar productos existentes (Myers y Montgomery, 1995). Para la fase de optimización se trabajaron respuestas duales bajo el método desarrollado por Derringer y Suich (1980) que optimizan conjuntamente dos respuestas teniendo rangos a priori de estas variables. Este método ofrece varias ventajas comparado con otros métodos desarrollados posteriormente (Myers y Montgomery, 1995).

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos en los cultivos, el modelo que mejor se ajustó para la concentración final de ingrediente activo fue el lineal (ecuación 2), para el cual el punto estacionario (que se interpreta como el punto óptimo) se encontró en el borde de la región experimental; esta condición llevó a realizar una exploración de la superficie por medio de gráficos en tres dimensiones (3d) y de gráficos de contornos, como se explica más adelante (Myers y Montgomery, 1995). Para minimizar en función del costo se ajustó un modelo cuadrático (ecuación 3). Esta exploración mostró que la variable respuesta peso seco presenta un comportamiento creciente, a medida que las concentraciones de los componentes del medio aumentan, sin observarse una zona en la superficie de respuesta donde se encuentre una curvatura que dé indicio de un máximo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La producción de biopesticidas basados en *B. thuringiensis* se realiza comercialmente por fermentación sumergida, bajo condiciones controladas que

Tabla 1. Composiciones en g/L de los siete medios estudiados inicialmente

Medio	Abarca (1992)	HCO (*)	HCO modif. (**)	Galán (1993)	Soler y Té-llez (2002)	Medio Leche (**)	Medio J. M. (**)
Harina de soya	6	-	-	20	2,9	-	-
Hidrolizado de caseína	-	-	-	-	0,5	-	-
Peptona de caseína	-	7	-	-	-	-	-
Extracto de levadura	-	-	-	-	-	0,1	0,1
Puré de tomate	40	-	-	-	-	-	-
Melaza	-	-	3	20	-	10	10
Leche	-	-	-	-	-	10	-
Jarabe de maíz	-	-	7	10	-	-	20
Glucosa	-	3	-	-	-	-	-
Maltodextrina	-	-	-	-	2	-	-
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,056	0,18	0,24	-	-	-	-
CaCO ₃	-	-	-	1	-	-	-
KH ₂ PO ₄	4,650	6,8	6,8	-	8	-	-
K ₂ HPO ₄	-	-	-	-	2	-	-
FeSO ₄ -7H ₂ O	0,028	0,02	0,0365	-	-	0,002	0,002
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	0,1	0,1
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,060	0,002	0,002	-	1	0,002	0,002
MnSO ₄ -4H ₂ O	0,026	0,002	0,0015	-	-	0,002	0,002
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0,014	0,014	0,014	-	-	0,002	0,002
KOH	-	-	-	-	3	-	-

* Avignone-Rossa y Arcas (1992).

** Medios propuestos por Grupo de Biopesticidas del IBUN (Pardo, 2003).

aseguren calidad y competitividad al producto. La cepa de *B. thuringiensis* utilizada fue aislada en el IBUN de muestras de suelo del departamento de Cundinamarca (Colombia), se mantuvo en cajas de Petri con el medio Luria Bertani (LB) (Cerón *et al.*, 1989) y le fue asignado el código IBUN 28.6.

El medio de cultivo empleado para la fermentación de *B. thuringiensis* debe contener: una fuente de carbono que suministra la energía para los procesos anabólicos (Mignone y Avignone, 1996), una fuente de nitrógeno de origen inorgánico y otra de origen orgánico para el crecimiento y la esporulación de la bacteria y para la síntesis de las endotoxinas (Sachidanandham *et al.*, 1997). Una fuente de carbono comúnmente utilizada es la melaza que en Colombia presenta las concentraciones medias que se indican en la tabla 2. Como fuentes de nitrógeno orgánico se emplean: el jarabe de maíz (tabla 2), la harina de soya (que contiene alrededor de 40% de proteína y 12% de lípidos), el extracto de levadura (Difco) y la caseína. Como fuente inorgánica de nitrógeno se evaluó el

sulfato de amonio (Merck). También es importante la adición de micronutrientes como calcio, potasio, manganeso, hierro y magnesio (Pardo, 2003).

Las fermentaciones se realizaron durante 96 horas (tiempo en el cual la esporulación es mayor al 80%), a 30 °C y agitación orbital de 200 rpm, relación de volúmenes 1:10 (volumen de medio/volumen de matraz), 25 mL de medio de cultivo en matraces de 250 mL para evitar la inhibición de crecimiento del bacilo por limitación de oxígeno. Los matraces se inocularon con asa directamente de una caja de Petri. En ensayos realizados en matraces agitados a escala de laboratorio se ha observado que la esporulación de *B. thuringiensis* pasa del 70 al 100% cuando el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) se incrementa de 38 a 220 h⁻¹ (Ríos y Buitrago, 1999).

En los cultivos se recuperó la biomasa para determinar el peso seco según el procedimiento descrito por Pardo (2003).

Tabla 2. Composiciones de la melaza y el jarabe de maíz empleados en los experimentos

Compuesto	Melaza*	Jarabe de maíz**
Sólidos (%)	78,5	50
Proteínas (%)	6,3	39
Azúcares reductores (%)	11,5	6
Cenizas (%)	16	20
pH	5,5	3,9
Densidad (g/L)	1414	1,2
Grados Brix	86	-

* Ingenio del Cauca, Incauca S. A., Cali, Colombia, 2002.

** Industrias del Maíz, Maizena, Cali, Colombia, 2002.

Las variables independientes o controladas (factores) corresponden a los diferentes componentes del medio de cultivo; como variables de respuestas se tomaron el peso seco o ingrediente activo y los costos de materias primas. Adicionalmente se fijaron algunos parámetros como: porcentaje de esporulación, tiempo de fermentación, pH y temperatura.

La primera fase de la experimentación se realizó con los medios seleccionados a partir de la literatura (tabla 1); de éstos se escogió el medio Galán que presentó mayores rendimientos en ingrediente activo. A partir de estos resultados, y en el marco de la metodología de superficies de respuesta, surgen dos alternativas de análisis (Myers y Montgomery, 1995): Si los resultados son más bajos que los reportados en la literatura, se aplicará la técnica llamada máxima pendiente en ascenso, que consiste en buscar una región donde pueda estar el punto óptimo. Si los rendimientos son mayores o iguales a los obtenidos con el medio de cultivo seleccionado, entonces no se busca una región de óptimo sino que se toma el medio base como punto central para buscar el punto óptimo.

Diseño experimental. La metodología de superficie de respuesta se basa en el ajuste de un modelo lineal en el cual se busca establecer una relación entre la o las variables respuesta y las variables independientes. Puesto que las variables y los niveles varían de un experimento a otro, es conveniente que los valores estén dados en forma estándar (Chávez, 1980); estas variables están representadas por x_1, x_2, \dots, x_k , y por lo general tienen media cero y varianza constante. En términos de variables codificadas la ecuación es escrita en la forma:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (1)$$

Debido a que esta relación entre la variable respuesta y las variables independientes se desconoce, el primer paso consiste en determinar una aproximación apropiada de esta relación. De esta aproximación depende el éxito de la superficie de respuesta. Por lo general se emplea un polinomio de primer o segundo orden sobre alguna región de las variables independientes. Si la respuesta es descrita correctamente por una función lineal, la función de aproximación es el modelo de primer orden:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n + \varepsilon \quad (2)$$

Pero si existe una curvatura en el sistema debe usarse un polinomio de orden mayor, por ejemplo, el modelo de segundo orden:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

Para estimar los parámetros del polinomio de aproximación se utiliza el método de mínimos cuadrados y el análisis de la superficie de respuesta se hace en términos de la superficie ajustada. La estimación de los parámetros del modelo se hace más eficazmente si se utilizan los diseños experimentales apropiados para recopilar datos (Montgomery, 2002).

Respuesta dual. En muchos casos no sólo se quiere optimizar una respuesta, sino dos o más al mismo tiempo. Cuando se tienen datos con múltiple respuesta y se analizan separadamente, los resultados no son muy satisfactorios, en especial cuando las respuestas están correlacionadas. Por ejemplo, análisis separados pueden conducir a conflictos en las recomendaciones sobre los niveles de los factores, es decir, un nivel de un factor puede mejorar una respuesta pero empeorar otra. Desde los años sesenta se han venido trabajando varios métodos (Cristancho, 2004) con el objetivo de optimizar respuestas duales (dos respuestas), uno de estos es el desarrollado por Derringer y Suich (1980) que tomó la función de deseabilidad desarrollada por Harrington (1965) y la adaptó para utilizarla en la metodología de superficies de respuesta. Esta función es una transformación de la variable respuesta a la escala 0 a 1, en donde 0 representa una respuesta no deseable y 1 representa la respuesta deseable; la optimización simultánea de varias respuestas es reducida a la optimización de una sola respuesta que es la media geométrica de las deseabilidades individuales.

Diseños compuestos centrales. El diseño compuesto central es probablemente el diseño experimental más utilizado para ajustar superficies de respuesta (Box y Hunter, 2000). Consiste en un factorial o factorial fraccionado 2^k aumentado por $2k$ puntos axiales $(\pm\alpha, 0, 0, \dots, 0)$, $(0, \pm\alpha, 0, \dots, 0)$, $(0, 0, \pm\alpha, \dots, 0)$, ..., $(0, 0, \dots, \pm\alpha)$, y n_c puntos centrales $(0, 0, 0, \dots, 0)$. Cada uno de estos tres componentes juega diferentes e importantes papeles dentro del diseño. Los puntos factoriales representan un diseño óptimo de varianza para modelos de primer orden o para modelos de primer orden más interacciones de dos factores. Los puntos centrales dan información acerca de la existencia de curvatura en el sistema. Si existe curvatura, la adición de puntos axiales lleva a una estimación eficiente de los términos cuadráticos (Hinkelmann y Kempthorne, 1984).

En el presente artículo se trabajó con la metodología de superficies de respuesta, tomando como región del óptimo las concentraciones del medio de cultivo seleccionado bajo un diseño compuesto central 2^4 . Los cuatro factores fueron: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, fuente compleja de nutrientes y sales. La cantidad de ensayos se determina según la cantidad de factores, aquí se tendrían 16 ensayos del componente factorial, más 8 ensayos por los puntos axiales, más n_c puntos centrales, en este caso resultaron 12 ensayos, para un total de 36.

Para el análisis se trabajó con los programas SAS versión 8 y con Design-Expert 6.10 (Design-Expert 6 User's Guide. 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de la fermentación se recuperó la biomasa para determinar el peso seco según el procedimiento descrito por Pardo (2003), obteniéndose los resultados de la tabla 3.

Se seleccionó el medio propuesto por Galán (1993) debido a que éste produjo las más altas concentraciones finales de ingrediente activo. A partir de este medio se propuso la matriz de experimentación para el diseño compuesto central (tabla 4). Dicha matriz está compuesta por los puntos factoriales (niveles 1 y -1), puntos axiales (niveles α y $-\alpha$) y puntos centrales (nivel 0).

Involucrando las variables y sus niveles reportados se elaboró la matriz de experimentación con 36 ensayos, cuyos resultados se presentan en la tabla 5, con los niveles de las variables codificadas.

Para ajustar un modelo a los datos se trabajó con el programa Design-Expert 6.10 (Design-Expert 6 User's Guide. 2001), estableciendo en primer término el orden del modelo que se debe ajustar. Como se trabajaron dos respuestas, primero se establecieron los modelos que se ajustan a cada respuesta y luego se optimizó conjuntamente.

Peso seco. Para que los supuestos de normalidad y homocedasticidad se cumplieran, primero se realizó una transformación de la variable respuesta; la transformación fue logaritmo natural. Todos los resultados mostrados a continuación corresponden a

Tabla 3. Resultados obtenidos con los medios de cultivo estudiados, medidos en peso seco, porcentaje de esporulación y morfología

Medio cultivo	Variable respuesta	Peso seco (g/L)	% de esporulación	Morfología del cristal	U.F.C. (Esp/mL) 10^{10}
Abarca (1992)		0,690	80	Bipiramidal grande y mediano	6,50
HCO *		0,477	75	Bipiramidal mediano y pequeño	22,00
HCO modificado**		0,558	85	Bipiramidal mediano	24,75
Galán (1993)		10,900	90	Bipiramidal grande	30,75
Soler y Téllez (2002)		0,790	95	Bipiramidal grande y mediano	22,40
Medio leche**		1,620	95	Bipiramidal mediano	-
Medio J. M.**		1,020	95	Bipiramidal mediano	-

* Avignone-Rossa y Arcas (1992).

** Medios propuestos por Grupo de Biopesticidas del IBUN (Pardo, 2003).

Tabla 4. Concentraciones en g/L para un diseño DCC 2⁴

Factor	Símbolo	Nivel				
		-α	-1	0	1	α
CaCO ₃	X ₁	0	0,5	1,25	2	2,75
Jarabe de maíz	X ₂	0	5	12,5	20	27,5
Melaza	X ₃	0	10	20	30	40
Harina de soya	X ₄	2,5	10	17,5	25	32,5

la variable transformada, sin embargo las conclusiones se dan en términos de la variable real.

En la tabla 6 se presentan los modelos propuestos; para el modelo lineal el p-valor (columna 6) es menor a 5% (nivel de significancia), por lo que el modelo que ajustaría los datos sería el dado por la ecuación (2), donde Y es el peso seco, α es el intercepto y βi son los coeficientes lineales del modelo.

Teniendo como base el modelo lineal, se procede a realizar el análisis de varianza para determinar la significancia de los componentes del modelo, es decir, cuánto aporta al peso seco cada factor del

medio de cultivo. Este análisis se presenta en la tabla 7 encontrándose que todos los componentes son significativos porque el nivel de significancia es menor del 5% (Prob>F); adicionalmente, la magnitud de la Prueba F (columna 5) nos dice que el componente harina es el que presenta mayor impacto sobre la respuesta.

En la tabla 7 se observa que la prueba de falta de ajuste (Lack of Fit) es no significativa (Montgomery, 1991), por lo que se puede concluir que el modelo propuesto se ajusta adecuadamente a los datos. El modelo matemático a ajustar es el dado en la ecuación (2) y los coeficientes de este modelo se estiman por medio del método de mínimos cuadrados. El modelo resultante se presenta en la ecuación (4) para variables no codificadas.

$$\text{Ln(Peso)} = 0,816 + 0,086 \cdot \text{CaCO}_3 + 0,0276 \cdot \text{Jarabe} + 0,0124 \cdot \text{Melaza} + 0,0367 \cdot \text{Harina} \tag{4}$$

Para que este modelo se ajuste adecuadamente a los datos, hay que hacer pruebas de diagnóstico

Tabla 5. Resultados de la experimentación para el diseño central compuesto con las variables codificadas

x1	x2	x3	x4	Peso seco	Costo/kg producto	x1	x2	x3	x4	Peso seco	Costo/kg producto
-1	-1	-1	-1	3,27	1116	0	2	0	0	10,92	635
-1	-1	-1	1	7,60	1122	0	-2	0	0	6,38	1017
-1	-1	1	-1	5,81	714	0	0	2	0	12,17	580
-1	-1	1	1	8,80	1026	0	0	-2	0	7,01	865
-1	1	-1	-1	8,49	474	0	0	0	2	16,58	690
-1	1	-1	1	12,12	734	0	0	0	-2	4,54	372
-1	1	1	-1	8,65	523	0	0	0	0	8,08	812
-1	1	1	1	13,53	695	0	0	0	0	9,46	694
1	-1	-1	-1	4,93	756	0	0	0	0	7,94	827
1	-1	-1	1	8,35	1030	0	0	0	0	8,79	747
1	-1	1	-1	7,26	582	0	0	0	0	14,34	458
1	-1	1	1	11,30	805	0	0	0	0	9,72	675
1	1	-1	-1	8,57	478	0	0	0	0	9,60	684
1	1	-1	1	13,06	687	0	0	0	0	7,20	911
1	1	1	-1	9,45	487	0	0	0	0	8,06	814
1	1	1	1	16,45	576	0	0	0	0	8,57	766
2	0	0	0	9,61	691	0	0	0	0	9,07	724
-2	0	0	0	8,66	763	0	0	0	0	8,42	779

del mismo, que consisten en probar los supuestos de normalidad y homocedasticidad (varianza constante) de los residuales (Montgomery, 1991; Hinkelmann y Kempthorne, 1984). Las pruebas que se contemplaron en este trabajo fueron la prueba de Shapiro-Wilk para normalidad (Montgomery, 1991), la prueba de Levene modificada (Montgomery, 2002) y el gráfico de residuales contrastados con los datos estimados (Montgomery, 1991) para homocedasticidad. Los resultados de estas pruebas son satisfactorios y el lector puede consultarlos en Escobar (2004); se usa este modelo para el análisis.

En la figura 1 se tiene la superficie de respuesta para la variable Peso Seco transformada y sin transformar, con niveles constantes de CaCO_3 y melaza. La respuesta aumenta a medida que se aumentan las concentraciones de los componentes; este comportamiento se observó en todos los componentes. En este artículo se presenta la gráfica que relaciona harina frente a jarabe (figura 1) porque son los componentes que más influyen en la respuesta.

Costo de materias primas por kg producto. Al igual que con peso seco, el costo de materias primas por kg producto fue transformado en la escala de logaritmo natural para que cumpliera los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

En la tabla 8 se observan los modelos propuestos para esta variable; se aprecia que los modelos

Tabla 6. Modelos propuestos para el ajuste de la variable Peso Seco

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	G.L.*	Cuadrados Medios	Valor F	Prob > F**
Media	162,98	1	162,98		
Lineal	3,31	4	0,83	65,04	< 0,0001
Interacción	0,10	6	0,02	1,43	0,2444
Cuadrático	0,01	4	0,00	0,26	0,9000
Residual	0,10	12	0,01		
Total	166,67	35	4,76		

*G.L. se refiere a los grados de libertad de cada modelo propuesto.

**Probabilidad > F: probabilidad de aceptar o rechazar la hipótesis de ajuste del modelo, se trabaja con un nivel de significancia del 5%.

lineal y cuadrático son significativos ($\text{Prob} > F$). Al comparar estos dos modelos por adición de términos, el cuadrático (ecuación 3) es el mejor modelo propuesto para ajustar los datos.

Tomando el modelo cuadrático, se pasa a estimar los coeficientes del modelo, sin embargo como este modelo tiene muchos parámetros para estimar y no todos son significativos para el costo, se utiliza el método "backward" para seleccionar los parámetros que si son significativos, obteniendo el mejor modelo (Searle, 1971). El modelo resultante se observa en la tabla 9.

En la tabla 9 se observa que aparte de los efectos lineales, la interacción jarabe*melaza y el efecto cuadrático de harina aportan a la respuesta, es decir, son significativos a un nivel de 5%. El valor F indica que las variables de mayor impacto sobre el costo son el jarabe y la harina. Por la prueba de Lack of Fit o falta de ajuste se observa que el modelo no

Tabla 7. Análisis de varianza para la variable de respuesta Peso Seco

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	Valor F	Prob > F	
Modelo	3,309	4	0,827	65,043	< 0,0001	significativo
CaCO_3	0,101	1	0,101	7,919	0,0086	
Jarabe	1,027	1	1,027	80,746	< 0,0001	
Melaza	0,368	1	0,368	28,925	< 0,0001	
Harina	1,814	1	1,814	142,582	< 0,0001	
Residual	0,382	30	0,013			
Lack of Fit	0,296	20	0,015	1,719	0,1900	no significativo
Error puro	0,086	10	0,009			
Total	3,691	34				

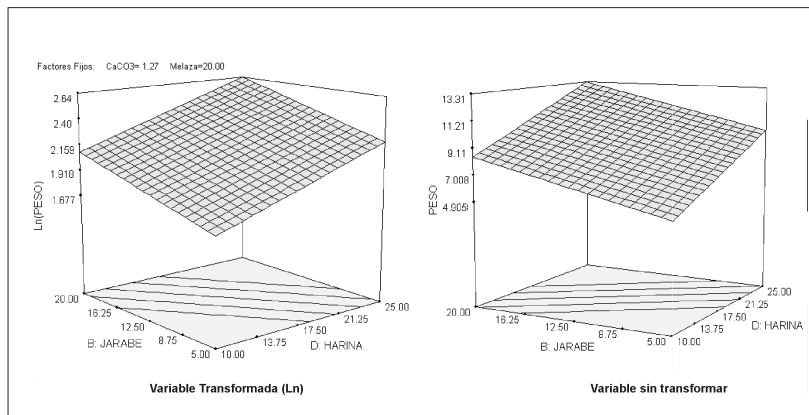


Figura 1. Gráficos de la superficie de respuesta para peso seco.

constantes los otros dos factores. Al observar todas las gráficas que resultan de la combinación de los factores, vemos el efecto cuadrático de harina en los gráficos de contornos (figura 3). De acuerdo con éstos, la concentración de harina presenta un efecto creciente sobre el costo, un máximo y vuelve a decrecer. Esto hace que variaciones de la concentración de harina en la variable costo tengan efectos de reducción a bajas y a altas concentraciones.

Tabla 8. Modelos propuestos para el ajuste de la variable Costo

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L*	Cuadrados medios	Valor F	Prob > F**
Media	1513,139	1	1513,139		
Lineal	1,523	4	0,381	18,642	< 0.0001
Interacción	0,083	6	0,014	0,625	0.7084
Cuadrático	0,305	4	0,076	6,778	0.0013
Residual	0,102	12	0,009		
Total	1515,275	35	43,294		

* G.L se refiere a los grados de libertad de cada modelo propuesto.
 ** Probabilidad > F: probabilidad de aceptar o rechazar la hipótesis de ajuste del modelo, se trabaja con un nivel de significancia del 5%.

Optimización conjunta. Teniendo los modelos ajustados para cada respuesta, se procede a realizar el método de optimización conjunta desarrollado por Derring y Suich. Este método utiliza la función de deseabilidad, sin embargo, para establecer esta función se necesita tener un conocimiento a priori de los rangos de valores deseables.

Como el objetivo es maximizar el ingrediente activo, pero a su vez minimizar los costos del medio, se trabajaron los criterios de la tabla 10. Estos criterios fueron establecidos por el grupo de investigación, teniendo en cuenta los resultados y análisis anteriores.

presenta problemas puesto que la probabilidad resulta mayor al 5%, por tanto no es significativa.

Al igual que con peso seco se probaron los supuestos del modelo, comprobándose que éste es adecuado para el análisis, por tanto, el modelo matemático que se debe ajustar es el dado en la ecuación (3) cuyos coeficientes se estiman por medio del método de mínimos cuadrados. El modelo resultante se presenta en la ecuación (5) para variables no codificadas.

$$\text{Ln(Costo)} = 6,537 - 0,08 * \text{CaCO}_3 + 0,0394 * \text{Jarabe} - 0,0178 * \text{Melaza} + 0,0787 * \text{Harina} - 0,0017 * \text{Harina}^2 + 0,0007 * \text{Jarabe_Melaza}$$

En la figura 2 se muestra la superficie ajustada para las variables Harina y Jarabe, manteniendo

Definidos estos criterios se procede a realizar el algoritmo de optimización, este método presenta varias soluciones que se muestran en la tabla 11; la mejor solución es aquella que presenta un valor de la función de deseabilidad más cercano a 1. En este caso la mejor solución es la presentada en el número 1, con una deseabilidad de 0,835, una respuesta estimada de peso seco de 16,8 y un costo aproximado de \$622.

La región óptima de las dos respuestas con los criterios de la tabla 10 se muestra en la figura 4. La región no sombreada es aquella delineada por los criterios de selección, en esta región se encuentra el máximo obtenido en la optimización numérica.

Tabla 9. Análisis de varianza para la variable Costo

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrados medios	Valor F	Prob > F	
Modelo	1,863	6	0,311	31,947	< 0,0001	significativo
CaCO ₃	0,086	1	0,086	8,869	0,0059	
Jarabe	0,770	1	0,770	79,173	< 0,0001	
Melaza	0,160	1	0,160	16,419	0,0004	
Harina	0,507	1	0,507	52,197	< 0,0001	
(Harina) ²	0,287	1	0,287	29,502	< 0,0001	
Jarabe*Melaza	0,054	1	0,054	5,524	0,0260	
Residual	0,272	28	0,010			
Lack of Fit	0,186	18	0,010	1,203	0,3940	no significativo
Error puro	0,086	10	0,009			
Total	2,136	34				

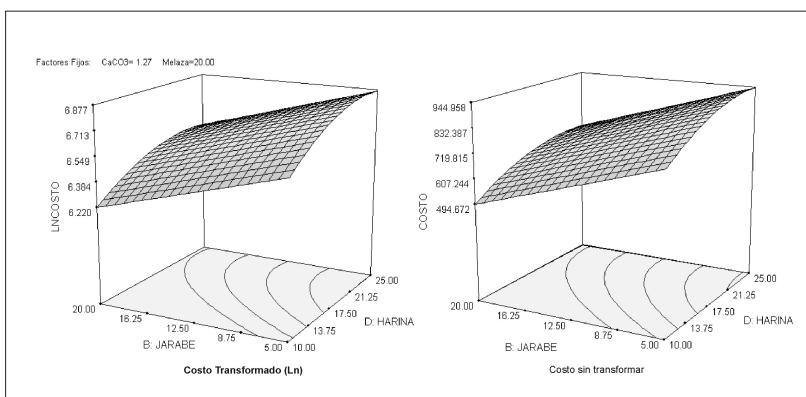


Figura 2. Gráficos de la superficie de respuesta para Costo.

El efecto de éstas sobre la concentración final del ingrediente activo es significativo, de acuerdo con los resultados obtenidos al desarrollar las matrices experimentales propuestas en este trabajo.

Con el modelo propuesto se observa que el comportamiento del producto de la fermentación (peso seco) es lineal con respecto a las concentraciones de carbonato de calcio, jarabe de maíz, melaza y harina de soya. Ninguna interacción de factores resultó significativa debido a que son fuentes muy complejas y, por tanto, cada una está aportando diferentes componentes.

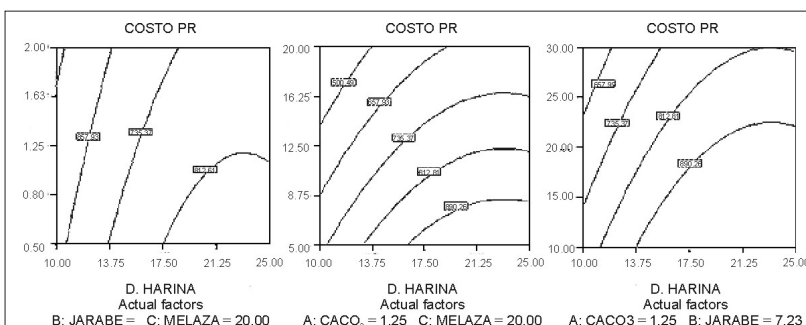


Figura 3. Gráficos de contornos para Costo.

La harina de soya es un sustrato complejo que contiene la mayoría de los nutrientes que requiere la bacteria para su crecimiento y desarrollo. Al comparar el comportamiento de la variable Peso Seco, en relación con los componentes del medio de cultivo, se aprecia que este componente –harina de soya–, es el que presenta mayor velocidad de asimilación por parte del microorganismo. El jarabe de maíz es muy rico en nitrógeno y factores de crecimiento, sin embargo, sus componentes se asimilan a menor velocidad que la harina de soya.

CONCLUSIONES

Los componentes del medio de cultivo corresponden a materias primas de bajo costo y amplia disponibilidad.

Tabla 10. Rangos para optimizar las respuestas.

Respuesta	Objetivo	Límite inferior	Límite superior
Peso Seco (g/L)	Maximizar	13	-
Costos (\$/Kg producto)	Minimizar	595	660

embargo, al combinar la variable Peso Seco con el costo por kg de producto se obtuvieron concentraciones de peso seco de 16,8 g/L a un costo de \$622/litro bajo concentraciones de CaCO₃, jarabe, melaza y harina de 1,94 g/L, 20 g/L, 30 g/L y 24,96 g/L, respectivamente.

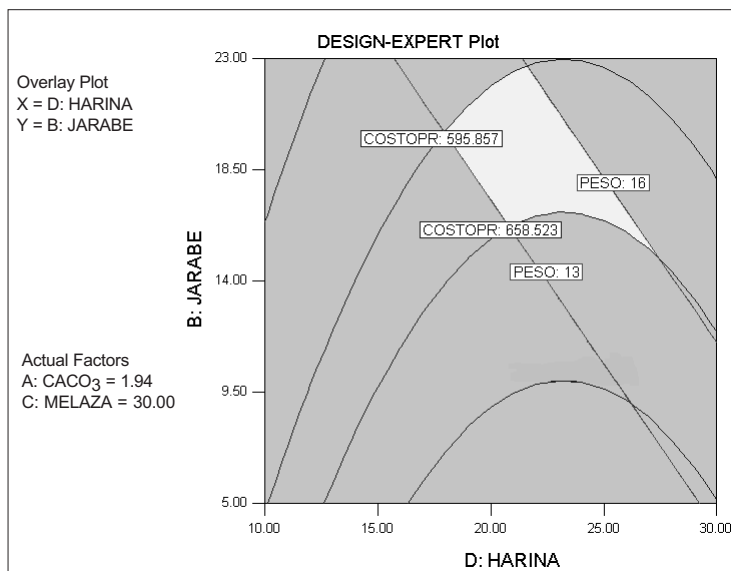


Figura 4. Gráfica de la región óptima dejando fijos CaCO₃ y melaza.

En general se delimitó una región de estudio aceptable en la cual se obtienen rendimientos altos, entre 13 g/L y 16 g/L, a un bajo costo por litro de medio, entre \$600 y \$670. Los resultados obtenidos a través de las técnicas empleadas se deben verificar con experimentos confirmatorios que ayuden a ratificar los modelos propuestos en este trabajo.

Un análisis separado de cada variable puede generar conclusiones erróneas. En el presente trabajo se emplea el análisis de respuestas duales, ampliamente utilizado, aunque presenta ciertas desventajas comparado con otras metodologías desarrolladas recientemente (Cristancho, 2004). Sin embargo, es una metodología de fácil aplicación, implementada en paquetes de estadística de libre acceso.

El efecto de las materias primas sobre el costo por kg de producto es significativo para todos los componentes. La harina de soya presentó un comportamiento cuadrático respecto al costo, correspondiendo al efecto que mayor incidencia presenta sobre esta variable respuesta.

Debido al comportamiento lineal de la variable respuesta Peso seco respecto a los factores estudiados, no se encontró un único punto máximo. Sin

Este trabajo muestra una manera diferente de analizar la información con ayuda de técnicas estadísticas que, aunque no son recientes, hasta ahora se están utilizando en el área de biotecnología en Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), por el apoyo financiero otorgado en el marco del Programa de Fortalecimiento de

Tabla 11. Soluciones para la optimización conjunta según método de Derrig y Suich

Número	CaCO ₃ (g/L)	Jarabe (g/L)	Melaza (g/L)	Harina (g/L)	Peso (g/L)	Costo (\$/Kg producto)	Deseabilidad
1	1,94	20,00	30,00	24,96	16,8086	621,81	0,835
2	1,93	20,00	30,00	25,00	16,8094	622,524	0,830
3	1,91	20,00	30,00	25,00	16,7782	623,508	0,822
4	2,00	19,98	30,00	20,66	14,4183	615,577	0,709
5	1,94	20,00	30,00	17,88	12,9597	595,915	0,640
6	2,00	20,00	12,84	25,00	13,6785	644,498	0,447

Centros de Desarrollo Tecnológico. Al ingeniero agrónomo Wilson Martínez por el soporte dado en la realización de bioensayos, al químico farmacéuta Ph. D. Jairo Cerón por el suministro permanente del microorganismo y la orientación; a las ingenieras químicas Patricia Téllez y Andrea Soler por el respaldo dado a la ejecución de los ensayos de fermentación, y al profesor Óscar Melo por su continua asesoría en el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, C.; Quintero, R. 1992. Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* var. *aisawai*. En: *Universidad: ciencia y tecnología*, 2(3), diciembre, pp. 51-53.
- Arcas, J.; Yantorno, O.; Arraras, E.; Ertola, R. 1984. A new medium for growth y delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurtaki*. *Biotechnology Letters*, 6: 495-500.
- Avignone-Rossa, C.; Arcas, J. 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and -endotoxin production in oxygen limited and non limited cultures. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 8: 301-304.
- Box, G. E. P.; Hunter, J. S. 2000. The 2^{k-p} fractional factorial designs, Part I. *Technometrics*. 42: 28-47.
- Ceron, J.; Abarca, C.; Quintero, R. 1989. ¿Qué son los bioinsecticidas? En: *Universidad: Ciencia y Tecnología*. México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 1(3): 66-70.
- Chávez, B. 1980. Metodología de superficies de respuesta, estudio de un caso. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Matemáticas y Estadística.
- Cristancho, C. A. 2004. Optimización dual mediante metodologías basadas en superficies de respuesta. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Estadística. Bogotá. Colombia.
- Derringer G y Suich R. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*. 12. 214-219.
- Design-Expert 6 User's Guide. 2001. Section 6 Response Surface Methods (RSM) Tutorials.
- Escobar, J. M. 2004. Ajuste de superficies de respuesta para la optimización de un medio de cultivo a base de B.t a nivel industrial. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Estadística. Bogotá, Colombia.
- Galán, L. J. 1993. Selección de cepas nativas y extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* (Hübner) *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis. Doctorado en ciencias especialidad microbiología. México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey.
- Harrington. 1965. The desirability function, *Industrial Quality Control*, 21 (10): 494-498.
- Hinkelmann, K.; Kempthorne, O. 1984. Design and analysis of experiments: introduction to experimental design. USA: John Wiley-Interscience.
- Liu, B. L.; Tzeng, Y. M. 1998. Optimisation of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Engineering*. 18: 413-418.
- Mignone, C. F. ; Avignone-Rossa, G. 1996. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 46: 78-84.
- Montgomery, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. México: Grupo Editorial Iberoamérica.
- Montgomery, D. 2002. Diseño y análisis de experimentos. 2^{da} edición. México: Editorial Limusa.
- Myers, R.; Montgomery, D. 1995. Canadá Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley and Sons.
- Pardo, E. M. 2003. Pasantía en el proyecto de investigación: escalamiento a nivel industrial de la producción de un biopesticida a base de la cepa nativa IBUN 90.1.98 de *Bacillus thuringiensis* (Berliner). Proyecto de grado (ingeniería química). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería.
- Pearson, D.; Ward, O. 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the crystal endotoxina. *Biotechnology Letters*. 10:451-456.
- Ríos R.; Buitrago, G. 1999. Transferencia de oxígeno en la fermentación con *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2(2): 43-50.
- Sachidanandham, R.; Jenny, K.; Fiechter, A.; Jayaraman. 1997. Stabilization and increased production of insecticide crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *gallerie*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 47: 12-17.
- Searle, S. R. 1971. Linear models, New York: John Wiley and Sons: 532.
- Smith, R. 1982. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 28: 1089-1092.
- Soler, A. P.; Téllez, R. P. 2002. Reformulación del medio de cultivo para la producción de α -endotoxina a partir de *Bacillus thuringiensis*. Proyecto de grado (ingeniería química). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería.