

Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv027)

Optimising culture medium for producing the yeast *Pichia onychis* (Lv027)

Andrés Díaz^{*}, Javier Flórez^{**}, Alba Marina Cotes^{***}

RESUMEN

La optimización de la producción masiva de la levadura *Pichia onychis* fue investigada usando varios sustratos y evaluando diferentes condiciones físico-químicas de fermentación líquida. Inicialmente se realizó un *screening* aplicando el diseño estadístico Plackett-Burman para evaluar tres fuentes de carbono y ocho fuentes de nitrógeno (tanto orgánicas como inorgánicas) con el fin de seleccionar los factores nutricionales más influyentes sobre el crecimiento de la levadura. Posteriormente, se evaluaron cuatro fuentes nutricionales y dos variables físico-químicas utilizando un diseño factorial fraccionado como punto de partida, para llevar a cabo después un proceso de optimización aplicando un diseño estadístico Central Compuesto Rotacional. Un modelo de regresión polinomial se desarrolló usando los datos experimentales; los resultados muestran que la producción de biomasa fue afectada significativamente por condiciones tanto nutricionales como físico-químicas del medio de cultivo; el máximo rendimiento obtenido fue de $8,95 \times 10^9$ células/mL equivalentes a una biomasa seca de 6,30 g/L, el cual se logró con las siguientes condiciones: 43,42 g/L de fuente de carbono, 0,261 g/L de fuente de nitrógeno orgánica, agitación de 110 rpm, pH = 6,0 con un tiempo de fermentación de 48 horas.

Palabras clave: *Pichia onychis*, optimización, fermentación líquida.

ABSTRACT

Optimising *Pichia onychis* yeast biomass production was evaluated using different substrates and different physicochemical conditions for liquid fermentation. The Plackett-Burman statistical design was initially applied for screening the most important nutritional variables (three carbon sources and eight nitrogen sources) affecting yeast biomass production. Four nutritional sources and two physicochemical variables were subsequently evaluated using a factorial fractionated design as the starting point for optimising the process by applying a central composite rotational design. The results obtained from employing a polynomial regression model using the experimental data showed that biomass production was strongly affected by nutritional and physicochemical conditions. The highest yield was obtained in the following conditions: 43,42 g/L carbon source, 0,261 g/L nitrogen organic source, shaking at 110 rpm, 6,0 pH, 48 h total fermentation time during which $8,95 \times 10^9$ cells/mL were obtained, equivalent to 6,30 g/L dry biomass.

Key words: *Pichia onychis*, optimisation, liquid fermentation.

* Ingeniero químico. Investigador Laboratorio de Control Biológico, Corpoica C. I. Tibaitatá
Correo electrónico: andresdiazg@yahoo.com

** Ingeniero químico. Investigador Laboratorio de Control Biológico, Corpoica C. I. Tibaitatá.
Correo electrónico: javiflorez11@hotmail.com

*** Ph. D. Fitopatología. Directora Laboratorio de Control Biológico, Corpoica C. I. Tibaitatá.
Correo electrónico: cotesprado@yahoo.com

Recibido: diciembre 10 de 2004 **Aceptado:** junio 30 de 2005

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas en frutas y hortalizas después de la cosecha provocadas por microorganismos fitopatógenos pueden alcanzar hasta un 50% en países en desarrollo dependiendo de las especies, métodos de cosecha, tiempo de almacenamiento, condiciones de comercialización, etc. (Wilson y Wisnieski, 1989). Tradicionalmente el uso de fungicidas sintéticos es la principal medida para el control de enfermedades en poscosecha; sin embargo, estos son costosos, pueden causar contaminación ambiental, pueden inducir resistencia en los patógenos y presentan problemas de toxicidad debido a su alta residualidad en los productos alimenticios (Wilson y Wisnieski, 1994). El control biológico de agentes patógenos mediante el uso de microorganismos biocontroladores es una de las alternativas más promisorias, dadas sus ventajas de sostenibilidad ambiental; de estos microorganismos, las levaduras han demostrado una alta actividad antagonista, se han aislado de la superficie de diversos frutos y no presentan efectos negativos sobre el hombre o los animales. En trabajos previos realizados en Corpoica, se seleccionó la levadura *Pichia onychis* cepa Lv027 por su alta actividad biocontroladora de *Botrytis cinerea* en cebolla de bulbo y *Rhizopus stolonifer* en tomate (García *et al.*, 2002). Sin embargo, para la utilización de este microorganismo a nivel comercial se requiere un proceso de desarrollo tecnológico que incluye la estandarización de las condiciones de producción masiva.

En general, las condiciones de cultivo son tradicionalmente optimizadas por la estrategia de una variable a la vez, es decir, cambiando un factor mientras se mantienen constantes los otros. Aunque esta estrategia es sencilla y no exige aplicar un análisis estadístico, requiere un gran número de experimentos y la interacción entre factores es ignorada. En contraste, los diseños experimentales basados en la estadística son aproximaciones más eficientes que pueden llevarse a cabo con un gran número de variables simultáneamente; además, se puede estimar la interacción entre variables. Actualmente, esta técnica ha sido ampliamente usada por diferentes investigadores para optimizar los componentes de un medio de cultivo, ya que es una herramienta eficiente que permite el desarrollo de modelos matemáticos empíricos (Masetto *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2002).

Una estrategia que permite generar un modelo con alta calidad de predicción es la utilización de modelos predictivos, ya sean matemáticos o gráficos, que permitan optimizar o maximizar la variable de respuesta evaluada.

Entre los muchos modelos disponibles, en el presente trabajo se decidió utilizar el Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR) ya que presenta varias ventajas sobre otro tipo de diseños experimentales, si se tiene en cuenta que permite generar una superficie de respuesta en la que se garantiza igual predicción del error a R unidades del centro en cualquier dirección, su uso se recomienda cuando se requiere obtener un modelo predictivo, es un diseño secuencial, y el modelo obtenido permite que se aproxime mediante la aplicación de un modelo polinomial de segundo orden (Panda *et al.*, 1999). Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue el de examinar mediante la utilización del mencionado diseño los efectos de las condiciones de cultivo sobre la producción de biomasa de la levadura *Pichia onychis* a nivel de erlenmeyer.

METODOLOGÍA

Microorganismo y medio de cultivo. El microorganismo usado en este estudio fue la cepa de levadura *Pichia onychis*, codificada como Lv027, suministrada por el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, C. I. Tibaitatá. El microorganismo fue mantenido en el medio YM que contiene: extracto de levadura (0,3%), extracto de malta (3%), dextrosa (1%), peptona (0,5%) y agar (1,5%) ajustado a un pH de 6,0. El cultivo se almacenó a 4 °C. Todos los experimentos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 125 mL que contenían 25 mL de medio, que fueron inoculados con 5 mL de una suspensión de células de levadura ajustada previamente a una concentración de 1×10^7 células/mL; cada tratamiento se desarrolló por triplicado.

Producción masiva. Métodos analíticos. Las materias primas (melaza, hidrolizado de soya, hidrolizado de levadura, hidrolizado de maíz), las cuales iban a ser utilizadas en los medios de producción masiva, fueron caracterizadas en el Laboratorio de Nutrición Animal de Corpoica, siguiendo protocolos previamente estandarizados, y se determinó proteína cruda por el método de Kjeldahl y azúcares reductores por el método de Nelson/Somogy.

La concentración celular se determinó mediante la técnica de conteo en cámara de Neubauer, para esto se suspendió 1 mL del caldo de fermentación en 10 mL de agua destilada estéril; a partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas y el resultado se expresó como células/mL.

La biomasa seca fue determinada por una técnica gravimétrica, se tomaron 50 mL del caldo de fermentación y se centrifugaron en una centrífuga Jouan G 4,11 a 4500 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se descartó y la biomasa húmeda se ubicó en un Analizador Halógeno de Humedad Ohaus MB-45 hasta obtener peso constante.

Diseño experimental y análisis de datos. Para estudiar los efectos combinados de tres fuentes de carbono con ocho fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de la levadura, se usó un diseño estadístico de *screening* Plackett-Burman como primer paso en el proceso de optimización, se mantuvo constante a través de este experimento una temperatura de 26 °C y una agitación de 150 rpm. Los factores y los niveles aplicados se muestran en la tabla 1, cada variable está representada por dos niveles: un nivel alto denotado por (+) y un nivel bajo designado por (-); el diseño implicó el montaje de 12 tratamientos experimentales por triplicado.

El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 8.1.

En la segunda etapa se aplicó un diseño factorial fraccionado para ajustar los niveles de las

variables seleccionadas en la etapa anterior y determinar su comportamiento al interactuar con dos variables físico-químicas influyentes en la fermentación líquida (pH y agitación). Los factores y los niveles aplicados se muestran en la tabla 2. Cada variable está representada por dos niveles: un nivel alto denotado por (+) y un nivel bajo designado por (-); el diseño implicó el montaje de 8 tratamientos por triplicado.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el paquete estadístico Minitab versión 13.32.

En la última etapa del proceso de optimización se determinó el nivel óptimo de cada variable independiente clave, previamente identificada en el diseño factorial fraccionado; para el desarrollo de este experimento se utilizó un diseño Central Compuesto Rotacional, que permitió evaluar los efectos cuadráticos y las interacciones de orden superior entre las variables y determinar así la naturaleza no lineal de la respuesta. Para los cálculos estadísticos, las variables independientes X_i fueron codificadas como x_i de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde x_i = valores codificados adimensionales de la variable X_i ; X_0 = valor de X_i en el punto central; ΔX = cambio en la magnitud de la variable. El comportamiento de la producción de biomasa fue explicado por la siguiente ecuación cuadrática:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde Y es la respuesta predecida, los subíndices i, j varían desde 1 al número de variables, β_0 es el término del intercepto, β_i son los coeficientes lineales, β_{ij} son los coeficientes cuadráticos. La ecuación (2) fue resuelta usando el paquete estadístico Statgraphics versión 5.0 para estimar la respuesta de la variable dependiente. En el modelo final se incluyeron solamente las estimaciones de los coeficientes con niveles significativos mayores del 90% (es decir, $p < 0,10$). El estadístico F se usó para evaluar la significancia del modelo. El diseño implicó el montaje de 31 tratamientos por triplicado.

Tabla 1. Factores analizados con un diseño Plackett-Burman y codificación de los niveles usados

Nombre del factor	Símbolo	Niveles del factor	
		Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
Melaza (g/25 mL)	X_1	0,25	1
Ácido orgánico (g/25 mL)	X_2	0,075	0,25
Fuente de carbono 2 (g/25 mL)	X_3	0,125	0,75
Hidrolizado proteico 1 (%v/v)	X_4	1,25	5
Hidrolizado proteico 2 (%v/v)	X_5	1,25	5
Hidrolizado proteico 3 (%v/v)	X_6	1,25	5
Homogeneizado proteico (g/25 mL)	X_7	0,05	0,20
Microelemento 1 (g/25 mL)	X_8	0,0125	0,05
Microelemento 2 (g/25 mL)	X_9	0,0125	0,05
Microelemento 3 (g/25 mL)	X_{10}	0,0125	0,05
Microelemento 4 (g/25 mL)	X_{11}	0,0125	0,05

Tabla 2. Factores analizados con un diseño Factorial Fraccionado y codificación de los niveles usados

Nombre del factor	Símbolo	Niveles del factor	
		Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
Melaza (g/25 mL)	X ₁	1	1,5
Fuente de carbono (g/25 mL)	X ₂	0,75	1,25
Homogeneizado proteico (g/25 mL)	X ₃	0	0,5
Microelemento 1 (g/25 mL)	X ₄	0,05	0,125
Agitación (r.p.m.)	X ₅	100	300
pH	X ₆	4,5	6,5

Tabla 3. Factores analizados con un diseño Central Compuesto Rotacional y codificación de los niveles usados

Variable	Símbolo	Valores de las variables a los niveles				
		-2	-1	0	1	2
Agitación (r.p.m.)	X1	100	150	200	250	300
Melaza (g/L)	X2	40	45	50	55	60
Homogeneizado proteico (g/L)	X3	0	0,125	0,250	0,375	0,5

Los factores y los niveles aplicados se presentan en la tabla 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño Plackett-Burman. La relación carbono-nitrógeno es el parámetro más importante en la producción de biomasa de la levadura *Pichia onychis* en fermentación líquida. Los resultados obtenidos se analizaron usando un análisis de varianza (Anova), la significancia de cada coeficiente se determinó usando los valores del estadístico P, donde valores de P < 0,1 indican alta significancia del correspondiente coeficiente. Se determinó que la variable más significativa fue el homogeneizado proteico (X₇) y la variable con el menor efecto fue el hidrolizado proteico 2 (X₅). De acuerdo con la Carta de Pareto (figura 1) se determinó que los factores con efectos significativos sobre la respuesta son, en su orden: homogeneizado proteico (X₇), microelemento 1 (X₈), fuente de carbono 2 (X₃) y melaza (X₁); el factor X₇ presentó signo negativo, lo que indica que la concentración adecuada

de homogeneizado proteico por evaluar en la siguiente etapa debería ser una concentración igual o menor que la usada en esta etapa; los demás factores presentaron signo positivo, lo que indica que se debe evaluar una concentración mayor que la usada en la siguiente etapa de selección.

Los factores ácido orgánico (X₂), hidrolizado proteico 1 (X₄), hidrolizado proteico 2 (X₅), hidrolizado proteico 3 (X₆), microelemento 2 (X₉) y microelemento 4 (X₁₁) no presentaron efectos significativos sobre la variable de respuesta.

Del análisis de los resultados obtenidos de los efectos estimados y del análisis de varianza, se puede concluir que los factores nutricionales seleccionados

para la siguiente etapa fueron: homogeneizado proteico (X₇), microelemento 1 (X₈), fuente de carbono 2 (X₃) y melaza (X₁).

Diseño Factorial Fraccionado. En esta etapa del proceso de optimización se evaluaron cuatro fuentes nutricionales (dos fuentes de carbono, una fuente de nitrógeno orgánica y una fuente de nitrógeno inorgánica) seleccionadas previamente y dos factores físico-químicos que se ha demostrado que tienen gran

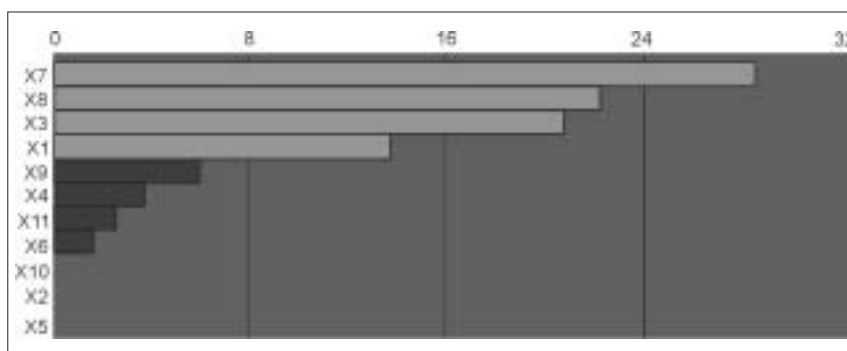


Figura 1. Carta de Pareto para biomasa aplicando un diseño Plackett-Burman. Codificación de los factores: X1 = melaza, X2 = ácido orgánico, X3 = fuente de carbono 2, X4 = hidrolizado proteico 1, X5 = hidrolizado proteico 2, X6 = hidrolizado proteico 3, X7 = homogeneizado proteico, X8 = microelemento 1, X9 = microelemento 2, X10 = microelemento 3, X11 = microelemento 4.

influencia en la producción de biomasa de levaduras: agitación y pH.

Se llevó a cabo un análisis de varianza de los resultados experimentales obtenidos y los efectos de cada variable se representaron gráficamente mediante una Carta de Pareto (figura 2); se concluyó que la fuente de nitrógeno orgánico (homogeneizado proteico) presentó el mayor efecto sobre la variable de respuesta con un coeficiente de 0,071 en comparación con las fuentes de carbono melaza y fuente de carbono 2 que tuvieron coeficientes de 0,023 y 0,005 respectivamente y con respecto a la agitación que presentó un efecto de 0,020. El factor pH mostró un efecto significativo de magnitud 0,013; sin embargo, para la etapa de optimización se seleccionaron los tres factores más significativos y el pH se ajustó a un valor de 6,0. La fuente de nitrógeno inorgánica y la fuente de carbono 2 no presentaron efectos significativos, con magnitudes de 0,002 y 0,005; por tanto, estas dos variables se aplicaron como parámetros en sus niveles altos en la última etapa de optimización.

Los rendimientos obtenidos expresados como biomasa estuvieron en un rango entre 4,48 g/L para el tratamiento 1 y 6,51 g/L para el tratamiento 6, y expresados como concentración de células estuvieron entre $6,65 \times 10^8$ células/mL para el tratamiento 8 y $1,11 \times 10^9$ células/mL para el tratamiento 3 (tabla 4).

Diseño Central Compuesto Rotacional. La secuencia experimental se llevó a cabo en dos bloques en el tiempo: en una primera secuencia experimental se evaluaron 16 tratamientos con 4 puntos centrales y en una segunda secuencia experimental se evaluaron 15 tratamientos con 3 puntos centrales. Los puntos centrales sirvieron para evaluar el error experimental.

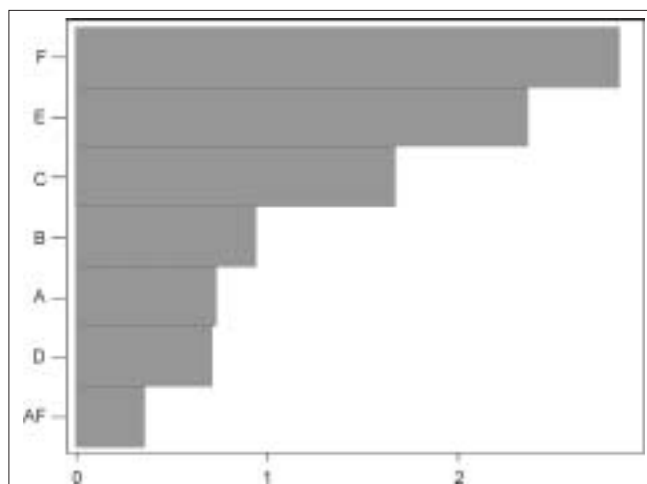


Figura 2. Carta de Pareto para biomasa aplicando un diseño factorial fraccionado. Codificación de los factores: A = pH, B = fuente de carbono 2, C = homogeneizado proteico, D = microelemento 1, E = agitación, F = melaza.

Cada una de las corridas experimentales se realizó por triplicado; la desviación estándar entre duplicados y puntos centrales fue menor del 10%, valor aceptable de acuerdo con el análisis estadístico. Para todas las fermentaciones se tomó como tiempo final 48 horas, como se había determinado en un trabajo previo (García *et al.*, 2002).

Se realizó un análisis de varianza para una regresión múltiple, con el fin de evaluar el efecto de las variables independientes sobre la variable dependiente (biomasa). En la tabla 5 se presenta el resultado arrojado por el software utilizado, en la tercera columna se presenta el error estándar que mide la desviación del efecto analizado, el cual estuvo alrededor del 4,5%; por ejemplo, para la agitación indica que los valores calculados para el modelo se alejan en promedio 0,3% de los datos experimentales. En general, el grado de ajuste del modelo fue del 91%, valor aceptable para la descripción de procesos biológicos.

Tabla 4. Matriz del diseño factorial fraccionado y resultados de producción de biomasa y concentración de células de la levadura *Pichia onychis* Lv027

Tratamiento	Factores						Biomasa (g/L)	Concentración (células/mL)
	Melaza	Fuente de carbono 2	Homogeneizado proteico	Microelemento 1	Agitación	pH		
1	1	1	1	1	1	1	4,48	$6,79 \times 10^8$
2	1	1	1	2	2	2	4,98	$1,01 \times 10^9$
3	1	2	2	1	1	2	5,98	$1,11 \times 10^9$
4	1	2	2	2	2	1	5,70	$9,84 \times 10^8$
5	2	1	2	1	2	1	6,35	$9,09 \times 10^8$
6	2	1	2	2	1	2	6,51	$8,67 \times 10^8$
7	2	2	1	1	2	2	4,91	$1,07 \times 10^9$
8	2	2	1	2	1	1	4,13	$6,65 \times 10^8$

Se presentó un efecto significativo de los factores nutricionales sobre la producción de biomasa de la levadura *Pichia onychis* evaluada.

En este análisis no se tuvieron en cuenta las interacciones de tercer orden porque, en general, no tienen efecto significativo al considerar un nivel de significancia del 10% (Moreno, 1995).

Tabla 5. Análisis de varianza para la regresión obtenida aplicando un Diseño Central Compuesto Rotacional

Anova para biomasa - 3 factores					
Efectos	Suma de cuadrados	G.L	Err. Est.	F	P
X1:Agitación	.00281667	1	.0028167	.86	.3092
X2:Melaza	.02535000	1	.0253500	5.56	.0000
X3:Homog. proteico	.01706667	1	.0170667	3.38	.0552
X1*X2	.04410000	1	.0441000	5.97	.0000
X1*X3	.00640000	1	.0064000	1.14	.2164
X2*X3	.00090000	1	.0009000	.62	.3914
X1*X1	.00666588	1	.0066659	1.15	.2109
X2*X2	.01825737	1	.0182574	3.40	.0420
X3*X3	.05406588	1	.0540659	4.19	.0001
Total error	.72763571	16	.0454772		
Total (corr.)	1.05667097	30			
$r^2 = 0.911389$		r^2 (ajustado para G.L) = 0			

nivel 0 y para la melaza no es clara la tendencia, ya que se presentan buenas productividades en casi todo el rango de niveles (entre -2 y 2).

Para realizar el análisis matemático de los resultados se remplazaron los coeficientes de regresión obtenidos para cada factor en la ecuación 2 y se estableció el modelo de regresión para la productividad en células (Y), previa decodificación del modelo de regresión empleando la ecuación 1; el modelo generado está en términos de las variables originales así:

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de las superficies de respuesta de los modelos obtenidos tanto para biomasa (datos no mostrados) como para la concentración de células (figuras 3 y 4); estas muestran los efectos relativos de dos variables cuando la concentración de la tercera variable se mantuvo en un nivel constante. Se observó que se presentó un máximo en la región del espacio explorada; para la agitación se observó una tendencia a maximizar la respuesta si se usa un nivel de -2, para el nitrógeno la tendencia es clara y muestra que las máximas productividades se obtienen cuando esta variable está cercana al

$$Y = -1.459 - 1.43 \times 10^{-3} X_1 + 10.64 \times 10^{-3} X_2 + 40.88 X_3 + 1.06 \times 10^{-5} X_1^2 + 1.58 \times 10^{-3} X_2^2 - 217.16 X_3^2 - 3.45 \times 10^{-4} X_1 X_2 - 0.0372 X_1 X_3 - 0.1325 X_2 X_3 \quad (\text{Ec. 3})$$

Esta ecuación tiene la ventaja de mostrar el efecto de cada factor independientemente de su nivel. De acuerdo con esta ecuación, la agitación tiene un efecto lineal negativo sobre la productividad, así como la melaza y la fuente de nitrógeno presentan un efecto lineal positivo. Así mismo, el efecto cuadrático del factor homogeneizado proteico fuente de

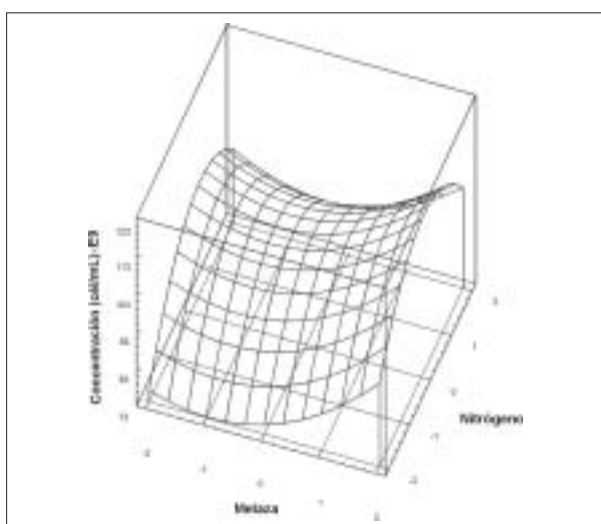


Figura 3. Superficie de respuesta obtenida para la concentración de células de la levadura *Pichia onychis* como función de nitrógeno y melaza con agitación constante.

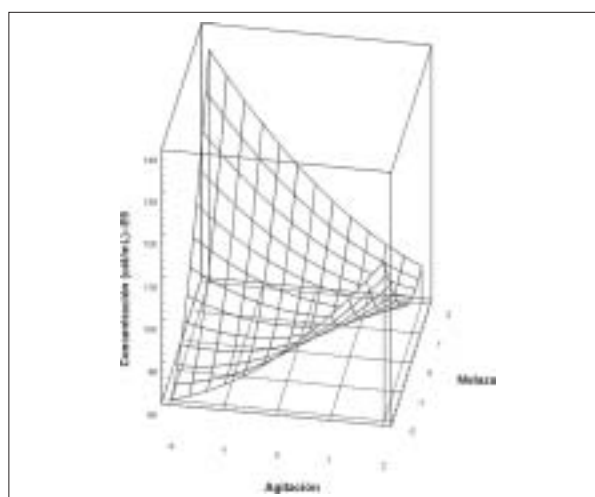


Figura 4. Superficie de respuesta obtenida para la concentración de células de la levadura *Pichia onychis* como función de agitación y melaza con homogeneizado proteico (nitrógeno) constante.

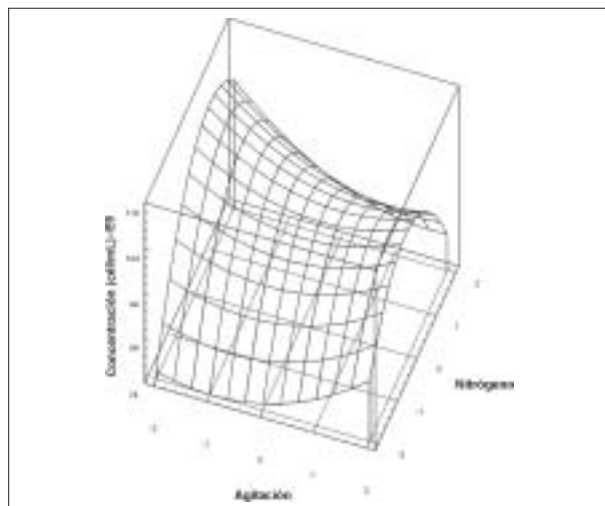


Figura 5. Superficie de respuesta obtenida para la concentración de células de la levadura *Pichia onychis* como función de agitación y homogeneizado proteico (nitrógeno) con melaza constante.

nitrógeno presentó el mayor efecto (positivo) sobre la productividad.

Para determinar las condiciones óptimas de producción de biomasa de *Pichia onychis* en función del modelo obtenido se aplicó una técnica de maximización matemática, los resultados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados obtenidos en las variables independientes utilizando el análisis matemático de optimización

Variable independiente	Código	Valor obtenido	Nivel
Agitación	X ₁	110,74 r.p.m.	-1
Melaza	X ₂	43,42 g/L	-1
Nitrógeno	X ₃	0,261 g/L	0

De la tabla 6 se observó que los resultados numéricos obtenidos concuerdan con los predecidos cualitativamente por el análisis gráfico, el nivel de concentración de la fuente de nitrógeno en el medio prácticamente no cambia (+7,8%) y los niveles de agitación y concentración de melaza deben reducirse (-26,7% y -16,25% respectivamente).

Reemplazando los valores obtenidos (tabla 6) en la ecuación de productividad (ecuación 3) se obtiene un rendimiento predecido, Y_P , de: $Y_P = 1,01 \times 10^{11}$ células/mL.

Estos resultados indican que los cambios que se le deben realizar al medio de cultivo para optimizarlo no son drásticos; sin embargo, el rendimiento se mejora notablemente ya que el valor de Y_P supera en un 42% el rendimiento obtenido con el mismo medio sin optimizar.

Adicionalmente, se mejora la economía del proceso, ya que se están disminuyendo las cantidades de materias primas por adicionar en el medio de cultivo para obtener el mismo rendimiento o superior.

Posteriormente, se llevó a cabo la validación de los resultados obtenidos con las condiciones nutricionales y de fermentación determinadas previamente (tabla 6); se obtuvo una concentración de células de $8,95 \times 10^{10}$ células/mL equivalentes a una biomasa seca de 6,30 g/L; estos resultados presentan un ajuste superior al 90% con respecto al modelo propuesto.

CONCLUSIONES

La aplicación de herramientas estadísticas y de diseño de experimentos demostraron ser estrategias útiles y eficientes para llevar a cabo la optimización de

medios de cultivo y la estandarización de condiciones de fermentación. El análisis demostró que las fuentes de carbono, nitrógeno y la agitación son los factores más influyentes sobre la producción de biomasa de la levadura *Pichia onychis* Lv027; además, a partir del análisis de las superficies de respuesta obtenidas al aplicar un Diseño Central Compuesto Rotacional se concluye que el balance de las magnitudes de los factores mencionados debe realizarse cuidadosamente con el fin de alcanzar regiones de óptima respuesta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Colciencias que financió el proyecto "Diseño y evaluación de un bioplaguicida a base de la levadura *Pichia onychis* (Lv027), para el control de *Rhizopus stolonifer* de poscosecha en tomate", código PN 25100015.

BIBLIOGRAFÍA

- García, P. G.; Jiménez, Y.; Neisa, A.; Cotes, A. M. 2002. Selection of native yeasts for biological control of postharvest rots caused by *Botrytis allii* in onion and *Rhizopus stolonifer* in tomato. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC wprs Bulletin*. 24: 181-184.
- Joo, H. S.; Kumar, C. G.; Park, G. C.; Kim, K. T.; Paik, S. R.; Chang, C. S. 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*. 38: 155-159.
- Masetto, A.; Flores-Cotera, L. B.; Díaz, C.; Langley, E.; Sánchez, S. 2001. Application of a complete factorial design for the production of zeaxanthin by *Flavobacterium* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92 (1): 55-58.
- Moreno, N. C. 1995. Estudio del cambio de escala en la fermentación acetobutílica. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia. 121 p.
- Panda, T.; Naidu, G. S. N.; Sinha, J. 1999. Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: a statistical view. *Process Biochemistry*. 35: 187-195.
- Wilson, C. L.; Wisniewski, M. E. 1989. Biological control of post-harvest disease of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 425-441.
- Wilson, C. L.; Wisniewski, M. E. 1994. Preface. In: *Biological control of postharvest disease theory and practice*. Wilson, C. L.; Wisniewski, M. E. (eds.) USA: CRC Press. 323 p.