

Optimización de un medio de cultivo salino para la producción de androstendiona a partir de colesterol usando la cepa *Mycobacterium sp. MB-3683*

✉ Sofía Borrego, María E. Espinosa, Elena Martí, Magdalena Fonseca

Laboratorio de Conservación Preventiva, Archivo Nacional de la República de Cuba. Compostela 906 esq. San Isidro, CP 10100, La Habana Vieja, Ciudad de la Habana, Cuba. Telf.: 8629436; E-mail: amac@ceniai.inf.cu

RESUMEN

Se optimizó por primera vez la composición de un medio de cultivo sintético para obtener androstendiona a partir del colesterol y con el empleo de la cepa mutante *Mycobacterium sp. MB-3683*. Se estudió la influencia de 5 fuentes de carbono y 9 fuentes de nitrógeno en la producción de androstendiona y el crecimiento y se obtuvo que el glicerol y el nitrato de sodio respectivamente fueron las mejores fuentes. Se empleó un diseño compuesto central bidimensional con $\alpha=1.5$ para optimizar las concentraciones de nitrógeno y fosfatos. Se obtuvo el óptimo para el crecimiento y la producción de androstendiona a una concentración inicial de 5 g/L de nitrato de sodio y 0.7 g/L de fosfatos (ácido y diácido de potasio) con glicerol al 2% y pH 6.

Palabras claves: biotransformación de esteroides, medio de cultivo sintético, optimización, diseño compuesto central, micobacteria, androstendiona

Biotechnología Aplicada 2004;01:21-24

ABSTRACT

Optimization of synthetic culture medium for androstenedione production from cholesterol by *Mycobacterium sp. MB-3683*. Optimization of the composition of the synthetic medium employed to obtain androstenedione from cholesterol in batch cultures of a mutant strain *Mycobacterium sp. MB-3683* has been studied for first time. The influence of five carbon and nine nitrogen sources on the AD production and growth were studied. Glycerol and sodium nitrate were respectively the best sources. The concentration of nitrogen and phosphates were optimized by the central composite design ($\alpha=1.5$). This showed that optimal AD production and growth were obtained at initial concentration of 5 g/L NaNO_3 and 0.7 g/L phosphates (K_2HPO_4 and KH_2PO_4) with glycerol at 2% and pH 6.

Keywords: biotransformation of sterols, synthetic culture medium, optimization, central composite design, mycobacteria, androstenedione

Introducción

El diseño de medios de cultivos óptimos para el desarrollo de procesos fermentativos es un aspecto de suma importancia. Para ello se utilizan las técnicas de diseño experimental, pues con la menor cantidad posible de experimentos se puede estudiar la influencia de varios factores y diferentes concentraciones de nutrientes sobre un proceso dado, que pudiera ser por ejemplo el crecimiento máximo del microorganismo o la producción máxima de un metabolito de interés.

Usualmente el medio de cultivo que se emplea para llevar a cabo la biotransformación de esteroides debe proporcionar un crecimiento abundante del microorganismo en estudio. Sin embargo, la naturaleza del sustrato esteroide puede influir en el medio seleccionado, de ahí que la composición del medio de cultivo influya en la bioconversión [1]. Por ello, el desarrollo de un medio de cultivo apropiado puede garantizar un rendimiento óptimo de la bioconversión.

El *Tall oil* polaco (subproducto de la industria maderera) y el β -sitosterol fueron biotransformados por *Mycobacterium sp. MB-3683* [2, 3] utilizando un medio de cultivo complejo. De ahí que no se haya notificado aún el empleo de un medio de cultivo óptimo para biotransformar esteroides empleando esta cepa. Borrego y cols. [4] publicaron la influencia de algunas vitaminas e iones sobre la bioconversión del colesterol usando este mutante, que lo cultivaron en un medio sintético.

El presente trabajo describe el desarrollo y optimización de un medio de cultivo sintético para producir androstendiona (AD) a partir del colesterol en cultivo discontinuo usando la cepa *Mycobacterium sp. MB-3683*.

Materiales y métodos

Microorganismo

Mycobacterium sp. MB-3683 es un mutante que degrada la cadena lateral de los esteroides para producir 4-androsten-3,17-diona (AD) como producto mayoritario [2, 3, 4]. En comparación con las cepas de referencia *Mycobacterium vaccae* SN 920 y SN 994, procedentes del Laboratorio de Referencia para el género de Centro de Investigación Borstel, Alemania, confirmaron que *Mycobacterium sp. MB-3683* es un miembro de la especie *M. vaccae* [5]. Cuando se realizó la digestión con las endoglucanasa *Bst* y *HaeIII*, el producto amplificado que se obtuvo fue el gen *hsp65*, que se usa en la diferenciación de cepas de micobacterias. Se demostró así que existe similitud entre las tres cepas comparadas [6].

Medios de cultivo

La cepa se conservó en sendos tubos de Agar Nutriente (OXOID) suplementado con glicerol al 2%. Para el inóculo se empleó el medio de cultivo publicado por Conner y cols. [7] suplementado con glicerol

1. Miller TL, Churchill BW. Substrates for large-scale fermentation. In: Demain AL, Salmond NA, editors. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington: ASM; 1986. p.122-6.

2. Szykula J, Hebda C, Orpiszewski J. Isolation and identification of a new metabolite of microbial conversion of upgraded neutral fraction of Polish tall oil by *Mycobacterium sp. MB-3683*. *Biotechnol Lett* 1992;13:917-22.

3. Sedlaczek L, Górmanski RM, Lisowska K. Effect of inhibitors of cell envelope synthesis on b-sitosterol side chain degradation by *Mycobacterium sp. MB-3683*. *J Basic Microbiol* 1994;34:387-99.

4. Borrego S, Pérez I, Espinosa ME, Martí E, Fonseca M. Influence of inorganic ions and vitamins on the biotransformation of cholesterol to androstenedione by *Mycobacterium sp. MB-3683*. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* 1997;28:59-61.

5. Korycka-Machala M, Ziolkowski A, Rumijowska-Galewicz A, Lisowska K, Sedlaczek L. Polycation increase the permeability of *Mycobacterium vaccae* cell envelopes to hydrophobic compounds. *Microbiology* 2001;147:2769-81.

6. Brzostek AM, Pawłowicz M, Dziadek J. The DNA probe and PCR assay as useful to control an acid fast bacteria-dependent biotechnological process. *Acta Microbiol Pol* 2001;50:37-44.

(0.5%) y Tween 80 (0.7%) a pH=7 (CNE). El medio basal para la producción de AD está compuesto para 1 litro por: NaCl 5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, FeSO₄·7H₂O 0.1 g, CaCl 0.1 g, MnSO₄·H₂O 0.05 g, pH=6. Este medio tenía (NH₄)₂SO₄ (0.1%) para estudiar la influencia de las fuentes de carbono en la biotransformación y glicerol (1%) al estudiar las fuentes de nitrógeno, cuyas concentraciones se ajustaron a 0.16 g/L de nitrógeno.

La suspensión de colesterol se preparó con 50 mg de colesterol (Merck, Alemania), 1 mL de una solución de Tween 40 (15%) y 4 mL de agua. Esta suspensión se esterilizó a 121 °C durante 15 min y se adicionó a 50 mL de medio basal en condiciones de asepsia para contar con una concentración final de colesterol y Tween 40 de 1 y 3 g/L respectivamente [4, 8].

Cultivos

La cepa se cultivó en el medio CNE durante 48 h a 30 °C en zaranda (200 r/min), posteriormente el cultivo se centrifugó a 7000 r/min por 10 min, el precipitado se lavó con una solución estéril de Tween 80 (0.7%) y se volvió a centrifugar en iguales condiciones. La biomasa resultante se suspendió en una solución de Tween 80 y se homogeneizó por agitación. Se tomaron 5 mL de esta suspensión de cultivo para inocular 50 mL del medio basal con colesterol que se encontraba en matraces de 300 mL. Los cultivos se incubaron a 30 °C en zaranda orbital a 200 r/min durante 6 días, al cabo de los cuales se extrajeron 5 mL. Estos cultivos posteriormente se esterizaron a 121 °C por 30 min [4].

Determinación de esteroides

Los cultivos estériles se acidificaron a pH=2 con HCl (3 mol/L) y se extrajeron con acetato de etilo 4 veces (4 x 100 mL). Los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se evaporaron al vacío. La determinación de AD a partir del crudo obtenido se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando un detector UV a 254 nm, una columna de fase reversa RP-18 de 5 mm (125 X 4) (Merck, Alemania), el sistema de solventes que se usó fue una mezcla agua-metanol (35:65, v/v) y un flujo de 1.5 mL/min. Se utilizó 17 α -metiltestosterona como patrón interno.

Determinación del crecimiento

Los 5 mL que se extrajeron de cada cultivo se centrifugaron en las condiciones descritas anteriormente. La biomasa se lavó 2 veces con agua destilada y por último se suspendió en 2 mL de una solución de NaOH (3 mol/L) y 1 mL de agua destilada, después se calentó en un baño a 100 °C por 10 min y se dejó reposar hasta su enfriamiento total. En el sobrenadante se determinaron las proteínas por el método de Lowry [9].

Evaluación de experimentos

Todos los experimentos se realizaron con 3 réplicas y los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA-1 y prueba de Duncan [10].

Diseño de optimización

Para optimizar la composición del medio de cultivo se analizó la influencia de diferentes factores sobre el crecimiento y la producción de AD. Las concentraciones

de las fuentes de nitrógeno (NaNO₃) y fosfatos (K₂HPO₄ y KH₂PO₄) se optimizaron mediante un Plan Compuesto Central Bidimensional (PCCB) con $\alpha=1.5$ [11] y para ello la fuente de carbono que se usó fue glicerol (2%) y colesterol 1 g/L (Tabla 1). Este modelo sigue una ecuación (1) donde Y_(AD,0 C) es un estimado que responde a los factores X₁ (NaNO₃) y X₂ (fosfatos).

$$Y=b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (1)$$

Todos los experimentos se realizaron por triplicado para contar con suficientes grados de libertad y poder estimar la pureza experimental. El modelo lineal que se empleó fue el sistema Statics para Windows, Versión 4.5.

Resultados y Discusión

Selección de las fuentes de carbono y nitrógeno

Las fuentes de carbono y nitrógeno que se usaron en este estudio se seleccionaron de los informes de Tsukamura [12] Herrera y cols. [13, 14]. Se emplearon 5 azúcares (glicerol, glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa) para medir el crecimiento y la producción de AD. La concentración inicial de 1% se mantuvo para todos los casos y se usó sulfato de amonio al 0.1% como fuente de nitrógeno.

Los rendimientos de AD que se obtuvieron con el empleo de los diferentes azúcares se compararon con el que se obtuvo al utilizar solamente colesterol (Tabla 2). Los rendimientos mayores se obtuvieron con glicerol y glucosa, entre los que no se detectaron diferencias significativas, seguidos por fructosa, la cual estimuló significativamente el crecimiento (equivalente a 5 g/L de biomasa, correlación de 0.997). En presencia de lactosa y sacarosa el rendimiento de AD fue similar al que se obtuvo con colesterol, de ahí que estos azúcares no estimularon el proceso de biotransformación esteroidea.

La influencia de los azúcares sobre la bioconversión de esteroides puede deberse a dos razones. La primera está relacionada con el hecho de que estas fuentes pueden estimular el crecimiento microbiano y la segunda a que pueden actuar como inductores o represores del sistema enzimático responsable del proceso de biotransformación [15]. En el caso de la fructosa está publicado que estimula la agregación celular y por tanto al ser los agregados muy grandes los rendimientos de AD disminuyen porque el sustrato esteroidea está menos accesible para aquellas células que están en el centro del agregado [16].

Tabla 1. Condiciones experimentales del Plan Compuesto Central Bidimensional con $\alpha= 1.5$

Exp.	(X ₁) NaNO ₃ (g/L)	(X ₂) Fosfatos* (g/L)
1	3.34	0.5
2	6.66	0.5
3	3.34	0.9
4	6.66	0.9
5	2.51	0.7
6	7.49	0.7
7	5.0	0.4
8	5.0	1.0
9	5.0	0.7

*K₂HPO₄ y KH₂PO₄ están en concentraciones similares.

Nota: Glicerol al 2% se usó como fuente de carbono

Colesterol se usó al 0.1% (p/v) disuelto en Tween 40 al 0.3% (p/v) pH inicial se ajustó a 6.

7. Conner AH, Nagaoka M, Rowe JW, Perlman D. Microbial conversion of Tall oil to C₁₉ steroids. Appl Environ Microbiol 1976;32:310-1.

8. Borrego S, Espinosa ME, Carballo ME, Moreira T, Martí E, Ramirez A. Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores esteroidales conservadas por liofilización durante 10 años. Biotecnología Aplicada 2001; 18:85-7.

9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.

10. López R. Finalidad del diseño de experimento. En: Diseño estadístico de experimentos. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1984. p. 33-105.

11. López R. Diseños cuadráticos. En: Diseño estadístico de experimentos. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1984. p. 175-8.

12. Tsukamura M. Identificación of Mycobacteria. Japan Mycobacteriosis Research Laboratory of the Natural Chubu Hospital 1984. p. 19-82.

13. Herrera A., Espinosa ME, Borrego S, Ramirez AM, Martí E. Efecto de la fuente de carbono en la producción de ADD a partir de los fitosteroles de la caña de azúcar, utilizando una cepa de *Mycobacterium*. Rev. CENIC Ciencias Biológicas 1995; 26:44-6.

14. Herrera A, Espinosa ME, Borrego S, Guillén F, Falero A. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de ADD a partir de los fitosteroles de la caña de azúcar, utilizando una cepa de *Mycobacterium*. Rev. CENIC Ciencias Biológicas 1995;26 47-50.

15. Kieslich K. Microbial side-chain degradation of sterols. J Basic Microbiol 1985; 25:461-74.

16. Borrego S, Niubó E, Ancheta O, Espinosa ME. Study of the microbial aggregation in *Mycobacterium* using image analysis and electron microscopy. Tissue & Cell 2000;36:494-500.

Tabla 2. Influencia de diferentes azúcares (1%) sobre la producción de AD y el crecimiento de la cepa *Mycobacterium sp. MB-3683*

Azúcares	Yp/s (%)	Proteínas ± DE (mg/mL)
Control	-	0.07 ± 0.01 (c)
No azúcar*	14.4 (c)	0.08 ± 0.01 (c)
Glicerol	38.1 (a)	0.28 ± 0.02 (b)
Glucosa	36.4 (a)	0.20 ± 0.03 (b)
Fructosa	26.0 (b)	0.48 ± 0.02 (a)
Lactosa	14.3 (c)	0.09 ± 0.01 (c)
Sacarosa	14.2 (c)	0.11 ± 0.02 (c)

Control: no se le adicionó ningún azúcar ni colesterol.

*Sólo se adicionó colesterol al 0.1% (p/v) disuelto en Tween 40 al 0.3% (p/v).

Yp/s- Rendimiento producto/sustrato añadido = (mg AD obtenido/mg colesterol añadido) x 100.

DE - Desviación estándar

n = 3

Notas: Se adicionó como fuente de nitrógeno (NH₄)₂SO₄ al 0.1%. pH inicial se ajustó a 6

0.07g/L de proteína fueron equivalentes a 0.87 g/L de biomasa (correlación = 0.997, p ≤ 0.05)

(b) y (c) son significativamente diferentes de (a)

(prueba de Duncan p ≤ 0.05).

Se estudiaron 9 fuentes de nitrógeno utilizando como fuente de carbono el glicerol (1%) y la concentración de nitrógeno se fijó a 0.16 g/L. Frente al nitrato de sodio se obtuvieron los rendimientos mayores de AD seguido por urea y nitrato de potasio. Además urea y acetato de amonio estimularon significativamente el crecimiento (la concentración de proteínas fue equivalente a 4.1 y 4.5 g/L de biomasa, respectivamente) (Tabla 3).

Este resultado concuerda con el informado por Imada y cols. [17] que usaron nitrato de sodio en la bioconversión del colesterol con el empleo de diferentes cepas de micobacterias con buenos resultados. También Herrera y cols. [14] obtuvieron los mayores rendimientos de AD utilizando nitrato de sodio y urea en la biotransformación de fitosteroles de caña de azúcar para otro mutante de micobacteria, *Mycobacterium sp. NRRL B-3683*.

Tabla 3. Influencia de las fuentes de nitrógeno sobre la producción de AD y el crecimiento de la cepa *Mycobacterium sp. MB-3683*

Fuente de nitrógeno	Yp/s (%)	Proteínas ± DE (mg/mL)
NaNO ₃	36.4 (a)	0.28 ± 0.02 (ab)
Urea	35.8 (a)	0.33 ± 0.01 (a)
KNO ₃	35.2 (a)	0.25 ± 0.02 (b)
Acetato de amonio	20.7 (b)	0.36 ± 0.01 (a)
NH ₄ NO ₃	0.9 (c)	0.05 ± 0.01 (c)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4 (c)	0.09 ± 0.01 (c)
NH ₄ Cl	0	0.07 ± 0.01 (c)
NH ₄ H ₂ PO ₄	0	0.07 ± 0.01 (c)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0	0.07 ± 0.01 (c)

Yp/s- Rendimiento producto/sustrato añadido = (mg AD obtenido/mg colesterol añadido) x 100.

DE- Desviación estándar

Notas: Nitrógeno se mantuvo constante a 0.16 g/L.

Glicerol se usó a 1%

pH inicial se ajustó a 6

n = 3

0.07g/L de proteína es equivalente a 0.87 g/L de biomasa (correlación = 0.997, p ≤ 0.05)

(b) y (c) son significativamente diferentes de (a) y (ab) (prueba de Duncan p ≤ 0.05).

Las sales de amonio, con la excepción del acetato de amonio, resultaron ser las peores fuentes de nitrógeno para la producción de AD y el crecimiento microbiano. Mientras que las sales de nitrato, con la excepción del nitrato de amonio, fueron las mejores. Este efecto positivo de las sales de nitrato pudiera deberse a la estimulación de la enzima nitrato-reductasa bajo las condiciones experimentales establecidas. Se plantea que varias especies de micobacterias son capaces de utilizar eficientemente urea, nitratos y nitritos [12,18-20] mediante la vía de la nitrato y nitrato reductasa para obtener amonio [21].

Optimización de la concentración inicial de NaNO₃ y fosfatos en el medio de cultivo sintético

A partir de los resultados que se obtuvieron anteriormente se consideró que el glicerol y nitrato de sodio son las fuentes de carbono y nitrógeno a utilizar en el medio de cultivo sintético que se propone en este estudio. La glucosa y la urea pudieran emplearse, pero la concentración de glucosa no debiera ser superior al 1% pues estimula la producción de testosterona. Se conoce que en las micobacterias la glucosa brinda aceptores electrónicos tanto por la vía glicolítica como por la de las hexosas monofosfato [22]. Por esta razón en la cadena respiratoria se va a establecer una competencia entre la glucosa y el sustrato esteroide para obtener aceptores de electrones. La glucosa evita las reacciones de oxidación y favorece las de reducción. De ahí que cuando este azúcar es adicionado al medio de cultivo en concentraciones superiores al 1% se incrementa la actividad de las enzimas 17-oxidoreductasa y 3-cetoesteroide-1,2-reductasa [23, 24]. También la presencia de urea junto a la glucosa en el medio estimula aún más la formación de testosterona [24].

Resultados que se obtuvieron previamente a través de otros diseños experimentales demostraron que los rendimientos de AD no disminuyen al emplear glicerol al 2% a pH=6. Además se demostró que concentraciones iniciales de nitrato de sodio de 2 g/L o superiores estimulan la producción de AD y el crecimiento, al igual que concentraciones de fosfatos entre 0.5 y 1 g/L. Estos resultados sirvieron para establecer el intervalo de concentración a estudiar en el diseño de optimización ($\alpha=1.5$), para el NaNO₃ fue de 2.51 -7.49 g/L y para los fosfatos (K₂HPO₄ y KH₂PO₄) entre 0.4 y 1 g/L, el glicerol se usó al 2% y el pH inicial se ajustó en 6.

La adecuación numérica de los resultados a la ecuación (1) derivó en las ecuaciones (2) para la producción de AD (Y_{AD}) y en la (3) para el crecimiento (Y_c) como funciones de NaNO₃ (X₁) y los fosfatos (X₂).

$$Y_{AD}=50.7 - 10.3X_1^2 - 7.8X_2^2 \quad r^2=0.985 \quad (2)$$

$$Y_c=0.55 \quad r^2=0.988 \quad (3)$$

En la ecuación (2) se observa un efecto cuadrático para ambos nutrientes, lo cual indica que la condición óptima está próxima a las concentraciones centrales. Con relación a esto, se observó un máximo en la producción de AD cuando las concentraciones iniciales de NaNO₃ y fosfatos fueron de 5 g/L y 0.7 g/L respectivamente.

La ecuación (3) muestra que el crecimiento no se afectó por las condiciones experimentales del diseño.

17. Imada Y, Osozawa T, Morimoto Y, Kinoshita M. Process for preparing Androstane steroids. US Patent 4, 397, 946. 1983 Aug 9.

18. Shinnick TM, Good RC. Microbial taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:884-901.

19. Ausina VR, Lonca JG. *Mycobacterium fortuitum* y otras micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. Control de Calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Revisión temática. 2002. Disponible en: URL: http://www.seimc.org/control/revi_Micobac/mfortu.htm.

20. Casal M, Guerrero A, Martín N, Moreno S, Nogales MC. Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones por Micobacterias. En: Picazo JJ, editor. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1999. Disponible en: URL: <http://www.seimc.org/protocolos/cap9.htm#3>.

21. De Turk WE, Berheim F Effect of ammonia, methylamine and hydroxylamine on the adaptive assimilation of nitrate and nitrite by *Mycobacterium*. J Bacteriol 1958; 75:691-6.

22. Ratledge C, Stanford J, Graze JJ, editors. Biology of Mycobacteria. Washington, New York: Academic Press; 1989 (Vol 3, Cap 2).

23. Llanes N, Hung B, Falero A, Pérez C, Aguila B. Glucose and lactose effect on AD and ADD bioconversion by *Mycobacterium sp.* Biotechnol Lett 1995;17:1237-40.

24. Borrego S, Espinosa ME, Martí E, Fonseca M. Conversion of cholesterol to testosterone by *Mycobacterium sp.* MB-3683. Rev CENIC Ciencias Biológicas 2000;31:17-20.

Es conveniente señalar que aunque las concentraciones de proteína fueron bajas durante todo el estudio, no quiere decir que el crecimiento haya sido pobre, pues al correlacionar la biomasa seca con las proteínas se obtuvo que 0.87 g/L de proteína fueron equivalentes a 1 g/L de biomasa (correlación=0.997 y $p \leq 0.05$). Estas bajas concentraciones de proteínas se deben a que las micobacterias se caracterizan por tener gran cantidad de ácidos grasos como componentes mayoritarios de su composición celular (aproximadamente un 80%) [22].

Se escogió un nivel igual o mayor al 95% para ambas funciones con el objetivo de comparar la significación de las medias experimentales. También se realizó la adecuación del modelo y la Tabla 4 presenta los resultados.

La figura 1 muestra el efecto del nitrato de sodio y los fosfatos sobre el rendimiento de AD. Se puede observar un máximo de producción en el centro del diseño, en este punto el balance carbono: nitrógeno: fósforo fue de 10:1:0.4.

Agradecimiento

Esta investigación fue financiada por el Centro Internacional para el Desarrollo de Investigaciones de Canadá, proyecto 87-1024. También los autores agradecen el asesoramiento estadístico brindado por el Dr. Francisco Martínez Luzardo así como al Dr. Gerardo Iglesias por donar el programa de computación que sirvió para el análisis de los resultados vinculados con los diseños experimentales.

Aprobado en diciembre de 2003.

Tabla 4. Adecuación del modelo para el Plan Compuesto Central Bidimensional, $\alpha = 1.5$. Análisis de varianzas

Fuente	Varianza	Grados de Libertad
Error puro	12.3	18
Error residual	22.3	6
F calculada = 1.12		F crítica = 2.66

El modelo es adecuado

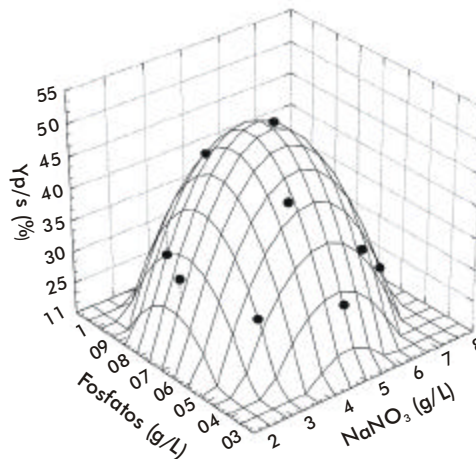


Fig. 1. Superficie de respuesta para la producción de AD. Plan Compuesto Central Bidimensional, $\alpha=1,5$. $n = 3$, $Y_{AD} = 50.7 - 10.3X_1^2 - 7.8X_2^2$