

**ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE UN INSECTICIDA
BIOLÓGICO A ESCALA PILOTO PARA LA EMPRESA PRODUCTOS
NATURALES DE LA SABANA S.A., ALQUERÍA.**

ANA LUCÍA LLANO ARANGO

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLÍN
2007**

**ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE UN INSECTICIDA
BIOLÓGICO A NIVEL PILOTO PARA LA EMPRESA PRODUCTOS
NATURALES DE LA SABANA S.A., ALQUERÍA.**

ANA LUCÍA LLANO ARANGO

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Procesos**

**Asesora: MRes. Valeska Villegas
Ingeniera Química MSc. Biotecnología
Coordinadora del Departamento de Biotecnología
Universidad EAFIT**

**Coasesor: MSc. Fredy O. Carvajal
Ingeniero Químico MSc. Biotecnología
Coordinador Área de Investigación y Desarrollo en Biotecnología
ALQUERÍA S.A.**

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLÍN
2007**

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Jurado

Ciudad y fecha:

A Dios por darme ésta oportunidad y por mostrarme siempre el mejor camino.

A mi Mamá por su inmenso amor, su confianza, esfuerzo, fortaleza, dedicación, amistad, ejemplo y apoyo. Todo lo que soy te lo debo a ti.

A mi papá por toda su sabiduría. Gracias profe.

A Juan por ser mi mejor y más grande amigo, por creer en mí y por apoyarme en todo momento.

A Luis por hacerme reír y llorar.

A Jorge Jaramillo por ser mi patrocinador de sueños.

A Laura, Mariana y Valentina por ser mi esperanza y mis ganas de seguir adelante.

Y a todos los que lucharon esta batalla conmigo.

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus agradecimientos a todas las personas que colaboraron en la realización de este proyecto:

Productos Naturales de la Sabana S.A. Alquería.

Fredy O. Carvajal, MSc. Ingeniero Químico, Coordinador área de Biotecnología Alquería S.A.

Valeska Villegas, MSc., Ingeniera Química, Profesora Universidad EAFIT.

Edelberto Silva, Químico Farmacéutico, Profesor Departamento de Química Farmacéutica, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Personal de los laboratorios de Ingeniería de Procesos, Edgar Arbeláez, Mauricio Londoño y Jhon Estrada.

Sigifredo Cárdenas, encargado del Laboratorio de Biotecnología Universidad EAFIT.

Jaime Escobar, Ingeniero Químico, Profesor Universidad EAFIT.

Laura Durango, Ingeniera de Procesos, Universidad EAFIT.

Paula Zapata, Ingeniera de Procesos, Universidad EAFIT.

Luisa Hoyos, Ingeniera de Procesos, Universidad EAFIT.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	19
1.1 GENERAL	19
1.2 ESPECÍFICOS	19
2. REVISIÓN DE LITERATURA	20
2.1 MOSCA DE ESTABLO, <i>Stomoxys calcitrans</i> (L.).....	20
2.2 CONTROL BIOLÓGICO.....	26
2.2.1 Bioinsecticidas	27
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.3.1 Generalidades	29
2.3.2 Condiciones y características de crecimiento.....	30
2.3.3 Fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.3.4 Obtención de biomasa	31
2.4 <i>Lactobacillus casei</i>	32
2.4.1 Generalidades	32
2.4.2 Fermentación Ácido Láctica.....	32
2.4.3 Obtención de Biomasa.....	34
2.5 ESCALAMIENTO DE PROCESOS BIOLÓGICOS.....	35
2.5.1 Criterios de Escalamiento	36
2.5.2 Coeficiente Volumétrico de Transferencia de Masa	37
2.5.3 El Reactor Biológico.....	39
3. DISEÑO METODOLÓGICO	45
3.1 Ubicación.....	45

3.2 Los microorganismos	45
3.3. Reactivos.....	45
3.4 Influencia de la temperatura en la producción de biomasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
3.4.1 Preparación del inóculo	46
3.4.2 Producción de biomasa de <i>S. cerevisiae</i>	47
3.5 Influencia de la velocidad de aireación en la producción de biomasa de <i>Lactobacillus casei</i>	49
3.5.1 Activación de la cepa.....	49
3.5.2 Preparación del inóculo	49
3.5.3 Producción de biomasa de <i>L. casei</i>	50
3.6 Diseño de experimentos.....	51
3.7 Determinación de los parámetros cinéticos.....	52
3.7.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento.....	52
3.7.2 Determinación de los Rendimientos	53
3.8 Determinación del Coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($K_L a$)	53
3.9 Escalado.....	53
3.10 Análisis de Prefactibilidad.....	55
3.10.1 Estudio de Mercado.....	55
3.10.2 Estudio Técnico	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1 Procesos Fermentativos.....	56
4.1.1 Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
4.1.2 Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato de <i>Lactobacillus</i> <i>casei</i>	64
4.2 Análisis de prefactibilidad	72
4.2.1 Estudio de mercado.....	72

4.2.2 Estudio técnico	82
5. CONCLUSIONES	103
6. RECOMENDACIONES.....	105
BIBLIOGRAFÍA.....	107

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>S. calcitrans</i>	21
Tabla 2. Productos comerciales para control de mosca	25
Tabla 3. Correlaciones para $K_L a$ en fluidos de baja viscosidad.	39
Tabla 4. Composición del medio MRS.....	46
Tabla 5. Diferentes criterios para cambio de escala en tanques geoméricamente similares, con medio y propiedades físicas constantes ($N_{Re} > 10^4$, $N_P = \text{constante}^*$).....	54
Tabla 6. Resultados de investigaciones realizadas por otros autores para la producción de biomasa de <i>S. cerevisiae</i>	58
Tabla 7. Rendimientos de Biomasa en sustrato, concentración máxima de biomasa y velocidades específicas de crecimiento para <i>S. cerevisiae</i>	59
Tabla 8. Rendimientos de biomasa en sustrato, concentración celular y velocidades específicas de crecimiento para <i>L. casei</i>	67
Tabla 9. Resultados encuestas realizadas a los ganaderos proveedores de Alquería S.A.....	74
Tabla 10. Productos a base de Bioinsumos Comercializados en Colombia	77
Tabla 11. Análisis DOFA.....	79
Tabla 12. Datos de operación y diseño del biorreactor a escala de laboratorio (2L) para <i>S. cerevisiae</i> y <i>L. casei</i>	84
Tabla 13. Propiedades del medio de cultivo para <i>S. cerevisiae</i> y <i>L. casei</i>	84
Tabla 14. Datos de diseño de los biorreactores de 20L, 200L y 2000L	85
Tabla 15. Parámetros de operación de los biorreactores para <i>S. cerevisiae</i>	90

Tabla 16. Parámetros de operación de los biorreactores para <i>L. casei</i>	90
Tabla 17. Especificaciones de los servicios industriales requeridos	92
Tabla 18. Tabla preliminar de equipos para el proceso	99
Tabla 19. Tabla de resumen de cargas y corrientes para el proceso de elaboración del bioinsecticida	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Stomoxys calcitrans</i> adulta	21
Figura 2. Comparación entre <i>Stomoxys calcitrans</i> adulta (izquierda) y <i>Musca doméstica</i> (derecha)	22
Figura 3. Ciclo biológico de la mosca <i>S. calcitrans</i>	23
Figura 4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Figura 5. <i>Lactobacillus casei</i>	34
Figura 6. Montaje de fermentación para <i>S. cerevisiae</i>	47
Figura 7. Dimensiones para un tanque agitado	86
Figura 8. Relación entre el Reynolds y tres tipos de impulsores	87
Figura 9. Diagrama general de entradas y salidas	95
Figura 10. Diagrama genérico de bloques	95
Figura 11. Diagrama de Bloques de Proceso	96
Figura 12. Diagrama de flujo de proceso	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Crecimiento celular y consumo de sustrato de <i>S. cerevisiae</i> a diferentes temperaturas.....	56
Gráfico 2. Producción media de Biomasa para <i>S. cerevisiae</i>	62
Gráfico 3. Rendimiento de biomasa en sustrato medio para <i>S. cerevisiae</i>	63
Gráfico 4. Velocidad específica media para <i>S. cerevisiae</i>	64
Gráfico 5. Crecimiento celular y consumo de sustrato de <i>L. casei</i> a diferentes velocidades de aireación.	65
Gráfico 6. Producción media de biomasa para <i>L. casei</i>	69
Gráfico 7. Rendimiento de biomasa en sustrato medio para <i>L. casei</i>	71
Gráfico 8. Velocidad específica media para <i>L. casei</i>	72

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A Método del Ácido dinitrosalicílico (DNS)	118
ANEXO B Metodología para la medición del $K_L a$	119
ANEXO C Encuesta ganaderos proveedores de Alquería S.A.....	123
ANEXO D Resultados fermentaciones <i>S. cerevisiae</i>	124
ANEXO E Resultados fermentaciones <i>L. casei</i>	125
ANEXO F Análisis estadístico para <i>S. cerevisiae</i>	127
ANEXO G Análisis estadístico para <i>L. casei</i>	129

RESUMEN

Debido a los problemas de salud, calidad y productividad que presentaban los hatos lecheros causados por la infestación de moscas, el departamento de Investigación y Desarrollo en Biotecnología de Alquería S.A. desarrolló un insecticida biológico a base de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus casei* capaz de combatir el problema de las moscas en los establos, salas de ordeño, corrales y potreros. Luego de verificar la efectividad del producto para la erradicación de las moscas, específicamente la mosca de establo *Stomoxys calcitrans*, se planteó la necesidad de escalar y diseñar conceptualmente un proceso de producción del bioinsecticida a nivel piloto.

En este trabajo se evaluó la producción de biomasa de *S. cerevisiae* a diferentes condiciones de temperatura (25 °C, 30 °C y 35 °C) y de *L. casei* ATCC 7469 a diferentes condiciones de aireación (0.5 vvm, 0.7 vvm y 0.9 vvm) con el fin de mejorar las condiciones de cultivo de los microorganismos. Las fermentaciones se llevaron a cabo en un sistema discontinuo a escala laboratorio, con un volumen de trabajo de 2 L. El medio de cultivo utilizado fue el planteado por el área de Investigación y Desarrollo en Biotecnología de Alquería S.A. para la elaboración del bioinsecticida.

Se encontró que la mejor condición de temperatura para la producción de biomasa de *S. cerevisiae* es a 30 °C, obteniéndose una concentración de 4.741 g/L en 12 horas. Para *L. casei* la condición de aireación a la cual se obtuvo la mayor concentración de biomasa fue a 0.7 vvm; dicha concentración fue de 6.410 g/L en 20 horas de fermentación.

El sistema para cada uno de los microorganismos fue escalado a dos biorreactores de 2000 L de trabajo, tomando como criterio de escalamiento el coeficiente volumétrico de transferencia de masa K_{La} , debido a que el suministro de oxígeno es un factor determinante para ambos procesos. Se realizó el diseño conceptual del proceso para la obtención del bioinsecticida a escala piloto y finalmente se hizo un análisis de beneficio – costo para evaluar la rentabilidad del producto.

Palabras claves: *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus casei*, mosca de establo (*Stomoxys calcitrans*), bioinsecticida, biorreactor, escalado, diseño conceptual.

INTRODUCCIÓN

La industria ganadera siempre se ha visto afectada por ataques de insectos que perturban el sistema nervioso de los animales, pues el ganado parasitado sufre no sólo por la pérdida de sangre, sino además porque las picaduras los irritan fuertemente (Kapongo y Giliomee, 2000). Algunas consecuencias son la reducción en el tiempo dedicado a su alimentación, lo que interfiere en la digestión y asimilación de los nutrientes, y en la disminución en la producción de leche, lo que genera menores ganancias para la industria. Adicionalmente se incrementa el gasto de energía para ahuyentar a las moscas y a esto se le suma un estado generalizado de tensión (Cruz-Vázquez et al., 1999).

Específicamente en los hatos de producción de leche, existe una gran población de mosca. Este díptero causa importantes daños en la producción, tanto por el efecto directo provocado al alimentarse de sangre como por las molestias que causan sus piquetes, manifestándose en nerviosismo, coleo y pateo, las cuales son expresiones generales de estrés (Cruz-Vázquez et al., 2000). La mosca evita la ganancia de peso del ganado y es responsable de la transmisión de muchas enfermedades, como fiebre de garrapatas (ranilla blanca), rayo, fiebre aftosa, mal de tierra, mastitis, entre otras. La enfermedad llamada Anaplasmosis bovina causada por la picadura de la mosca de establo (*Stomoxys calcitrans*) afecta la producción lechera, tanto por la cantidad producida como por la calidad de la leche (Cruz-Vázquez et al., 1999).

Se calcula que una vaca plagada de moscas puede perder 1/4 de litro de sangre al día y disminuir su producción de leche en un 20%. Esto quiere decir que si produce 5 litros de leche diarios, disminuirá un litro al día (Anónimo 1, 2005).

Para el desarrollo de la industria agrícola es importante contar con un control de plagas efectivo y que no tenga efectos negativos sobre el medio ambiente y su entorno. Los insecticidas químicos han proporcionado un control eficaz pero son perjudiciales para la salud humana y el ecosistema, por lo tanto, a nivel mundial se han buscado otras alternativas que suplan el uso de insecticidas químicos. Actualmente los bioinsecticidas constituyen una alternativa viable en el control de plagas a partir de formulaciones comerciales de microorganismos (Jiménez y Rojas, 2003).

Productos Naturales de la Sabana, Alquería S.A. es una empresa procesadora de leche que tiene como propósito “ofrecer al consumidor productos lácteos y alimentos de excelente calidad, contribuyendo así a la nutrición y salud de la población”. Es por esto que se preocupa porque la leche que compra a sus proveedores sea de excelente calidad y porque las condiciones de mantenimiento de las vacas en los hatos sean las mejores. Para ofrecer una solución a sus proveedores y poder garantizar la calidad de su leche, el Departamento de Investigación y Desarrollo en Biotecnología de Alquería S.A. desarrolló un insecticida biológico capaz de combatir el problema de las moscas en los establos, salas de ordeño, corrales y potreros.

Luego de realizar las pruebas y los análisis necesarios para comprobar la efectividad de este producto a escala de laboratorio y de campo, se vio la necesidad de realizar el diseño conceptual de su proceso de producción, de conocer los posibles nichos de mercado y las condiciones de elaboración y tratamiento final del producto.

Para realizar el diseño conceptual de la planta piloto es necesario llevar a cabo un escalamiento desde la etapa de laboratorio con el fin de seleccionar las condiciones de diseño y procedimientos de operación, para asegurar que el efecto de las diferentes variables sobre el proceso sean las mismas en unidades de

diferente tamaño y así obtener rendimientos similares con una calidad de producto equivalente o superior (Hincapié et al., 2005).

El presente trabajo consiste en llevar a cabo la evaluación experimental de los parámetros de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus casei*; el escalamiento de la producción del bioinsecticida desde el nivel de banco hasta una escala piloto, basado en el coeficiente de transferencia de masa $K_L a$; así como el diseño conceptual de la planta piloto de proceso.

1. OBJETIVOS

1.1 GENERAL

Escalar el proceso de producción a escala banco de un insecticida biológico para uso en el control de la mosca de establo (*Stomoxys calcitrans*) en hatos lecheros, utilizando como criterio de escalamiento el coeficiente volumétrico de transferencia de masa $K_L a$.

1.2 ESPECÍFICOS

- Identificar el mercado potencial del insecticida biológico para tener una aproximación a la factibilidad económica de éste, mediante visitas a los ganaderos, encuestas y observación directa.
- Evaluar la cinética de crecimiento de *Lactobacillus sp.* bajo diferentes condiciones de aireación; y la cinética de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes temperaturas, por medio de la medición de la producción de biomasa y el consumo de sustrato, para establecer el parámetro óptimo para cada uno de los microorganismos.
- Escalar la fermentación óptima por el método del $K_L a$ con el fin de reproducir la producción de biomasa.
- Diseñar conceptualmente el proceso de producción del bioinsecticida a escala piloto por medio de la elaboración del diagrama de flujo del proceso, planos y cálculos correspondientes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

En las fincas ganaderas es común encontrar altas poblaciones de insectos, específicamente de moscas que están presentes en todos los lugares, desde los potreros hasta las salas de ordeño. Lo más importante es que estas altas poblaciones interfieren en la productividad del hato y en la calidad de la leche. Específicamente la mosca de establo *Stomoxys calcitrans* (L.), está presente en todos los lugares donde se encuentre el ganado y debido a su incidencia sobre el mismo es importante estudiar la manera de controlar su población por medios biológicos.

2.1 MOSCA DE ESTABLO, *Stomoxys calcitrans* (L.)

La “mosca de establo” o “mosca brava”, *Stomoxys calcitrans* (L.) (Figura 1), constituye un importante parásito externo hematófago del ganado lechero estabulado y del ganado de carne mantenido en corral de engorde (Foil y Hogsette, 1994), aunque también puede afectar a los demás animales domésticos y al hombre (Campbell *et al.*, 1993). Este ectoparásito se presenta en todo el mundo y tiene un fuerte impacto económico en la producción ganadera debido a que causa reducción en la ganancia de peso y en la producción de leche (Bruce y Decker, 1958). Su clasificación taxonómica se describe en la tabla 1.

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *S. calcitrans*

Phylum:	Arthropodo
Clase:	Insecta
Orden:	Diptera
Suborden:	Cyclorhapha
Superfamilia:	Muscoidea
Familia:	Muscidae
Subfamilia:	Stomoxys
Género:	Stomoxys
Especie:	calcitrans

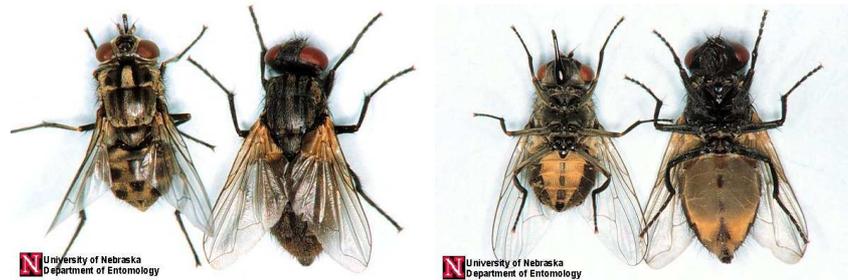
Figura 1. *Stomoxys calcitrans* adulta



Fuente: Kalisch, 2006

Es una mosca semejante a la mosca común (*Musca domestica*) (Figura 2) por su tamaño y aspecto. El adulto mide aproximadamente de 5 a 6 mm. Los individuos adultos, generalmente se posan sobre las patas de los animales con la cabeza hacia arriba y las alas con sus puntas bien separadas. Su color es gris parduzco. La más exterior de las cuatro rayas torácicas está interrumpida y el aspecto del abdomen es cuadriculado. La mosca tiene una probóscide con forma de aguja. Son grandes voladoras capaces de recorrer distancias largas. En verano son inquietas, muy activas y se alimentan diariamente; en cambio en invierno con una sola comida les alcanza para todo el día ya que su metabolismo basal y su nivel de actividad decaen considerablemente (Campbell *et al.*, 1993).

Figura 2. Comparación entre *Stomoxys calcitrans* adulta (izquierda) y *Musca doméstica* (derecha)



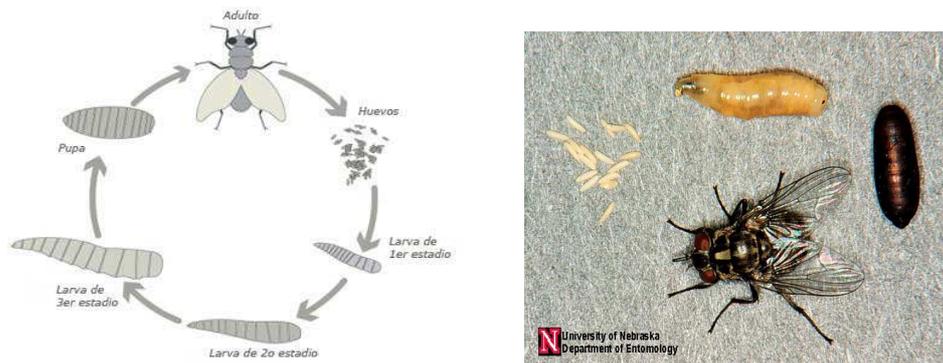
Fuente: Kalisch, 2006

La mosca de los establos produce una parasitosis externa muy difundida por todo el mundo, que causa malestar e irritación en los animales y pérdidas económicas en la producción. Esta parasitosis es producida por la picadura de la mosca adulta. Tanto los machos como las hembras son parásitos hematófagos obligados suctopícoros, esto significa que pican y succionan la sangre del hospedador para poder alimentarse. Los adultos viven entre 3 y 4 semanas (Campbell, 2006).

El ciclo biológico completo (Figura 3) dura de 14 a 21 días aproximadamente, con temperatura entre 24 y 30° C y humedad adecuada (Lysyk, 1993). En cambio, cuando las condiciones climáticas no le son favorables, disminuye el metabolismo (diapausa) lo que hace que este período llegue a durar 30 días. Es entonces, más corto en verano que en invierno. La hembra deposita los huevos en grupos de 40-50 por vez en el estiércol de los animales (generalmente de bovinos y equinos), en materia en descomposición, y en vegetales fermentados. Puede poner hasta 600 huevos durante toda su vida y tarda hasta 72 horas para que de ellos eclosionen unas pequeñas larvas blancas. Estas van a internarse en el material orgánico, que les sirve de sustrato, buscando la capa más seca que les va a servir para transformarse en pupas a las cuales les toma 6 días más para llegar a ser adultos. A las pocas horas de haber nacido, las hembras comienzan a alimentarse y un día

después copulan; 4- 5 días después empiezan a depositar los huevos (Campbell y Duane, 2006).

Figura 3. Ciclo biológico de la mosca *S.calcitrans*



Fuente: Kalisch, 2006.

La acción parasitaria que ejerce *S. calcitrans* sobre los animales se explica por su acción como parásito hematófago obligado. La constante irritación de los hospedadores causa alteraciones en la fisiología de la lactancia y pérdida de peso, mayor dificultad para la ganancia de peso y baja eficiencia en la conversión del alimento. Se asocia también a la generación de nerviosismo e imposibilidad de los bovinos para alimentarse adecuadamente (Byford *et al.*, 1992). El valor de los cueros provenientes de animales que sufrieron las acciones succionadoras de la mosca se disminuyen considerablemente. En este caso el deterioro de los cueros parece estar asociado al nivel de inflamación de la piel por las picaduras. Este es un proceso alérgico y los factores individuales tienen mayor importancia que la magnitud de la infestación (Miller, 1995).

Como vector mecánico de enfermedades *S. calcitrans* interviene presumiblemente en la transmisión de: Miasis (infestación por larvas de dípteros), Ántrax (infección bacilar) y Zurra (anemia infecciosa equina), entre otras (Gojmerac, 2001).

Control de la mosca de establo *Stomoxys calcitrans*.

El control de la mosca del establo se realiza principalmente por medio del uso de insecticidas químicos que actúan sobre los estados adultos, y también con medidas de manejo sanitario. Sin embargo, las estrategias de control se pueden complicar y ser poco efectivas, debido a que *S. calcitrans* posee un comportamiento biológico diversificado que le permite utilizar sitios alternativos de reproducción, movimientos de migración y el uso de múltiples huéspedes incluido el hombre (Foil y Hogsette, 1994).

El control con insecticidas químicos generalmente muestra una moderada eficacia debido a que las moscas tienen un período de escaso contacto con el portador mientras realizan la hemossucción. Las medidas sanitarias, como la remoción periódica de estiércol y los desperdicios de alimento y forraje de los corrales, son recomendadas para lograr un mejor control de la mosca del establo en el ganado confinado. A pesar de esto, es práctica común el uso intensivo de los insecticidas químicos en el control de este ectoparásito, ya que representa una alternativa de fácil aplicación. Esta práctica ha propiciado informes de resistencia en *S. calcitrans* a diversos compuestos, como el DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano (ClC_6H_4)₂CH(CCl₃)) (Kunz, 1991), lindano, clordano, eldrin, dieldrin, toxafeno y malation (Drummond, 1977).

Algunos productos comercializados en la actualidad para el control de la mosca del establo y su descripción se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Productos comerciales para control de mosca

NOMBRE	LABORATORIO	INDICACIÓN
Neguvon (Metrifonato al 97%) (Triclorfón al 90%)	BAYER	Antiparasitario de amplia acción para uso interno y externo. (Organofosforado), contra mosca; larvas de mosca.
Expert	INTERVET	Orejera mosquicida a base de Diazinón
Ciperhit	COLVET	Cipermetrina
Bayofly cutáneo	BAYER	Para el control de moscas picadoras en bovinos.
GANABAÑO (clorfenvinfos, fosforado altamente activo)	NOVARTIS	Cipermetrina 15g x 100 mL. Garrapaticida e insecticida, activo contra las moscas <i>Stomoxys calcitrans</i> y <i>Liperosia irritans</i> (mosca brava y mosca de los cuernos).
CIPERMETRINA TÉCNICA (Rotisyn 15%)	SYNTHESIS VETERINARIA	Garrapaticida e insecticida de amplio espectro.

Para poder sobrevivir a la constante presión de los insectos, el ser humano ha recurrido a los insecticidas químicos, estos se han aplicado indiscriminadamente sobre el ganado y zonas aledañas para reducir temporalmente la población de insectos, lo cual ha generado en los sobrevivientes mecanismos de resistencia y contaminación ambiental (Parrodi y Martínez, 2000).

El control químico es la medida de combate más utilizada a nivel mundial desde hace mucho tiempo para el control de plagas y consiste en la utilización de productos que en su mayoría son compuestos químicos o venenos cuyo objetivo es matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas.

Los insecticidas deben ser usados en las cantidades adecuadas para que no causen problemas. En muchos lugares del mundo su excesivo uso conlleva a la contaminación de las aguas cuando estos productos son arrastrados por la lluvia provocando eutrofización de las aguas, mortandad en los peces y otros seres vivos y daños en la salud humana (Inga, 2006).

Con todas las dificultades y consecuencias de impacto ambiental, basadas en el uso del control químico de insectos plaga, se plantea una interesante salida a este flagelo con el control biológico (Bello, 1994).

2.2 CONTROL BIOLÓGICO

El uso de microorganismos para la obtención de productos para el sector agropecuario es una de las aplicaciones más antiguas de la biotecnología. Con el tiempo se han ido seleccionando microorganismos específicos y cepas de desempeño superior y a partir de ellas se han desarrollado productos comerciales para fertilización o nutrición animal, así como para el control biológico de plagas (Drugueri, 2005).

El control biológico es la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales para limitar su población. A estos organismos se les llama agentes de control y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parásitos, así como microorganismos patógenos de insectos.

Las formulaciones comerciales de estos microorganismos son conocidas como bioinsecticidas e incluyen diferentes géneros y especies de bacterias, hongos, nemátodos y virus. Estos microorganismos denominados entomopatógenos son específicos, es decir, afectan sólo a determinados grupos de insectos y

generalmente son inofensivos para insectos benéficos, humanos y otros organismos superiores (Torres *et al.*, 2002).

2.2.1 Bioinsecticidas

Los bioinsecticidas son productos que atacan los insectos plaga y que contienen como ingrediente activo, un microorganismo o una sustancia extraída de un ser vivo mediante procedimientos que no alteran su composición química (Fernández, 2002).

Los productos biológicos presentan como principales ventajas: la especificidad en su actuación y que no causan ningún impacto negativo sobre el medio ambiente. Además, contrario a los productos químicos, no se presenta generación de resistencia (Fernández, 2002). Sin embargo, también tienen algunas desventajas frente a los productos químicos comerciales, como una efectividad de control en general menos rápida, mayor exigencia técnica en la producción a nivel comercial y por ser partículas vivas o proteínas en medio natural, son relativamente sensibles a las condiciones de almacenamiento y al ambiente como la temperatura, la radiación UV y la humedad (Burges, 1998).

Para la fabricación de productos a base de Agentes de Control Biológico (ACB) se deben tener en cuenta algunos aspectos a fin de obtener un producto adecuado. Se debe definir un medio de cultivo óptimo y el mejor sistema para la obtención masiva de inóculo que permita una buena relación costo-beneficio en la producción. Se debe escalar el proceso de producción desde un volumen pequeño, asegurando la estabilidad del producto y determinando las condiciones adecuadas de almacenamiento. Se debe garantizar que para su aplicación final se pueda utilizar un equipo convencional (Burges, 1998). El costo de la dosis debe ser similar o menor a la de los agroquímicos y su efectividad superior o por lo menos similar (Fernández, 2002).

Los organismos formulados son suspendidos en un vehículo adecuado, el cual es suplementado con aditivos que maximizan la supervivencia del producto durante el almacenamiento, optimizan la aplicación en el campo y protegen los organismos después de la aplicación (Borges, 1998).

Bioinsecticidas comerciales: Los primeros intentos de manejar plagas utilizando enemigos naturales, datan de 1930 en que se introdujo desde Singapur el parasitoide *Eretmocerus serius silvestre* (Avispita amarilla de la India) para el control de la mosca prieta de los cítricos *Aleurocanthuswoglumi sabih* (Vázquez y Castellanos, 1997).

En la actualidad se utiliza una gran diversidad de microorganismos para controlar las plagas recurrentes en los cultivos de interés comercial para el hombre. Algunos de ellos son: la bacteria *Bacillus thuringiensis*, empleada para la producción de bioinsecticidas contra lepidópteros, dípteros, ácaros, entre otros (Jiménez Y Rojas, 2003); el hongo *Beauveria bassiana*, para el control de larvas de *Diatraea saccharalis*, talador de la caña de azúcar (Estrada,1997); *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* y *Paecilomyces lilacinus*, que actúa sobre nemátodos fitopatógenos que afectan los cultivos de banano, café, flores, frutales, plátano, tomate y arroz (Cepeda-Siller, 2001). Recientemente comenzó a producirse en algunos laboratorios *Nomuraea rileyi* y *Paecilomyces fumosoroseus*. También se produce el hongo antagonista *Trichoderma spp.* para el control de hongos fitopatógenos del suelo (Anónimo 2, 2007).

Para llevar a cabo una buena formulación de un bioinsecticida es necesario conocer a fondo los microorganismos que hacen parte del producto, el medio de cultivo en el cual se llevarán a cabo las fermentaciones, las condiciones óptimas de crecimiento, la cantidad de biomasa producida, y el rendimiento, entre otros factores. Los microorganismos presentes en el bioinsecticida formulado por

Alquería S.A. son la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Lactobacillus casei*, cuyas principales características se describen a continuación.

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

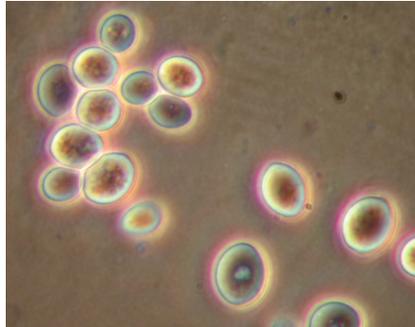
2.3.1 Generalidades

Las levaduras son hongos microscópicos, unicelulares, que presentan diversidad respecto al tamaño celular, forma y color, aun tratándose de células individuales de una misma cepa, debido principalmente a la alteración de las condiciones físicas y químicas en el ambiente. Sin embargo generalmente son de forma esférica u ovalada y miden de 5 a 10 micras. Viven en estado aislado hasta que adquieren el tamaño adecuado para dividirse, produciendo células hijas que a su vez se separan, se extienden y dividen de la misma manera. Se consideran como organismos facultativos, lo cual significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno (Guilliermond, 1920).

De las levaduras, la especie *Saccharomyces cerevisiae* se constituye en la más estudiada. En 1980 fue utilizada para la producción de la vacuna de hepatitis B y en 1996 se convirtió en el primer organismo eucariota al cual pudo establecerse la secuencia genómica completa, convirtiéndose en la referencia de comparación para las secuencias de humanos, genes animales o vegetales y múltiples organismos unicelulares. Durante años ha sido usada para la elaboración de vino, cerveza, pan y para investigación principalmente de aplicaciones industriales y medicas, benéficas para la vida humana (Feldmann, 2005).

Del griego *sákchar*, latín *saccharum*, (azúcar) y *mykes* (hongo) y del latín *cerevisia* (cerveza); *Saccharomyces cerevisiae* (figura 4), mas conocida como “la levadura de la cerveza” es un hongo ambiental común y es un componente transitorio de las microbiotas digestiva y cutánea humanas (Anónimo 2, 2006).

Figura 4. *Saccharomyces cerevisiae*



2.3.2 Condiciones y características de crecimiento

Existen varios factores que tienen una importancia particular en el crecimiento de levaduras. Para *Saccharomyces cerevisiae* la temperatura mínima, óptima y máxima es de 0-5, 30-35, y 40-41° C respectivamente. La temperatura a la cual la levadura es destruida depende de un gran número de variables como la composición del medio de cultivo, la duración de la acción térmica y la condición de cada microorganismo. Las esporas de *S. cerevisiae* son más resistentes a la muerte térmica que las células en forma vegetativa. La luz del día estimula la formación de esporas de *Saccharomyces cerevisiae* pero la luz ultravioleta destruye las levaduras en muy corto tiempo (Guilliermond, 1920).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura anaerobia facultativa que se reproduce rápidamente en presencia amplia de oxígeno; necesita para su crecimiento una fuente de carbono, fuente de nitrógeno (sulfato amónico, urea o aminoácidos), Biotina (vitamina B₈ o vitamina H), sales y elementos traza (Livense y Lim, 1982).

2.3.3 Fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*

La mayoría de las levaduras usan azúcares como su principal fuente de carbono y energía. En la producción de *S. cerevisiae* la mayor fuente de energía es la glucosa y la glucólisis es la principal vía para la conversión de glucosa en piruvato. La producción de energía en forma de ATP es acompañada de la generación de NADH para las vías biosintéticas (Feldmann, 2005). El uso del piruvato en la generación de energía puede darse mediante la respiración en presencia de oxígeno o por fermentación en ausencia del mismo.

La fermentación aeróbica (anabolismo) de *S. cerevisiae* es igual al de las plantas, se alimenta, respira y se multiplica. Mediante procesos reductivos usa los azúcares para la producción de biomasa; la tasa de transporte del piruvato a la mitocondria es igual al transporte de azúcar a la célula, se produce dióxido de carbono como el mayor metabolito con poca generación de etanol y ocurre una alta tasa de consumo de oxígeno y sustrato. Bajo condiciones anaeróbicas (catabolismo), se remueven electrones del sustrato o se usan intermediarios para generar energía, la tasa de consumo de azúcar es más alta que la tasa de consumo de piruvato a la mitocondria y el metabolismo favorece la producción de etanol y dióxido de carbono, con una tasa de consumo limitado de oxígeno y un bajo rendimiento en la producción de biomasa (Feldmann, 2005).

2.3.4 Obtención de biomasa

La producción comercial de levadura en la actualidad es llevada a cabo en un proceso a múltiple etapa, las primeras se realizan en batch, y las últimas, en batch alimentado. Se han mencionado prácticas comerciales de procesos de 8 etapas que conducen a una producción final de 100 toneladas de levadura prensada en 2 semanas y otra en 5 etapas con una producción comercial de 125 ton. en 65 h.

Según Rudolf *et al* (2000) es posible obtener una concentración celular de 65 g/L de *S. cerevisiae* en un cultivo batch de 40 horas de duración y que finaliza fed – batch durante 25 horas.

2.4 *Lactobacillus casei*

2.4.1 Generalidades

El género *Lactobacillus* comprende un grupo de bacterias ácido lácticas anaerobias facultativas de tipo gram positivo, lo que significa que tienen una membrana celular interna rodeada por una pared celular gruesa de peptidoglicano cuya función es dar rigidez al cuerpo celular y permitir el paso de nutrientes, enzimas y sustancias de desecho (Gómez, 2004). Pueden tener forma de bastones alargados o de coco. Su movilidad es limitada. En muy raras ocasiones se ha reportado su efecto patógeno (Madigan *et al.*, 2000), para algunas especies tales como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Barrantes, *et al*, 2004)

Se encuentran principalmente en productos lácteos como leche, yogures o quesos, en granos, carne, cerveza, vegetales entre otros productos alimenticios. Igualmente, hacen parte de la flora normal de los animales monotérmicos, incluyendo al humano, encontrándose en la boca, en el tracto intestinal y la vagina (Madigan *et al.*, 2000).

2.4.2 Fermentación Ácido Láctica

Las fermentaciones ácido lácticas son llevadas a cabo por bacterias ácido lácticas, principalmente *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, entre otros, que por lo general son bacterias gram positivas, no esporuladas, no móviles (Prescott, 2002), las cuales consiguen la energía necesaria para su crecimiento a partir de la fermentación de carbohidratos

produciéndose principalmente ácido láctico (Palleroni, 1970), aunque también es posible encontrar etanol y dióxido de carbono.

Prácticamente cualquier carbohidrato o alguno de sus derivados pueden hacer las veces de fuente de carbono para la generación de energía por parte de los microorganismos; entre ellos se encuentra el almidón, la celulosa, la lactosa, la sacarosa, la glucosa y la fructosa, entre otros (Castillo, 2004).

El crecimiento de las bacterias ácido lácticas se da en forma continua hasta que la fuente de carbohidratos se agote o las condiciones de temperatura o pH no sean las adecuadas para continuar con su crecimiento (Jiménez Y Rojas, 2003).

El fósforo es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos. El azufre tiene un importante rol estructural a nivel de ciertos aminoácidos y vitaminas. El potasio es requerido por todos los organismos y gran variedad de enzimas. El magnesio tiene la función de estabilizar los ribosomas, la membrana celular y ácidos nucleicos (Madigan *et al.*, 2000).

Lactobacillus casei ATCC 7469 (figura 5) es empleado en la elaboración de productos lácteos y para enriquecer jugos de frutas, quesos y complementos alimenticios; ha demostrado que mejora el proceso digestivo y que se establece en el intestino grueso, previniendo enfermedades infecciosas, incluso las generadas por virus. Se le empleó con éxito en una investigación encaminada a desarrollar métodos novedosos para la prevención de alergias ocasionadas por alimentos (Wicken *et al.*, 1983). Así mismo, *Lactobacillus casei* ATCC 7469 presenta un efecto benéfico sobre las defensas naturales, la eliminación de toxinas y microorganismos que ocasionan diarrea, como los rotavirus (Manderson y Doelle, 1972).

Figura 5. *Lactobacillus casei*



2.4.3 Obtención de Biomasa

Generalmente, las cepas de *Lactobacillus*, especialmente *L. casei* son empleadas para la producción de ácido láctico, el cual tiene múltiples aplicaciones en la industria de alimentos, la industria farmacéutica y la industria cosmética, entre otras. La producción de ácido láctico se realiza de forma anaeróbica, en un sistema de fermentación por lote alimentado, obteniéndose bajas concentraciones de biomasa y altas concentraciones de producto, esto se debe principalmente a la inhibición que se presenta por el mismo.

La producción de biomasa a partir de *L. casei* se lleva a cabo principalmente para la elaboración de productos prebióticos y probióticos para alimentación humana y animal. Existen numerosos medios de cultivo en el mercado para la fermentación de *L. casei*, pero se han realizado múltiples investigaciones con el fin de formular un medio no láctico con el fin de elaborar productos con alto contenido de microorganismos y que sean de bajo costo.

En la investigación realizada por Jaramillo y Millán (2005) se encontró que es posible cultivar *Lactobacillus* en un medio de cultivo con melaza de caña, obteniéndose una concentración celular de 8.98 g/L a 37 °C y 150 rpm.

2.5 ESCALAMIENTO DE PROCESOS BIOLÓGICOS

Escalamiento significa un cambio en la escala de volumen de un proceso. Este cambio generalmente viene acompañado de dificultades debido a que muchos de los parámetros de proceso se encuentran directamente relacionados con el tamaño y geometría estructural del reactor. De esta manera, en biotecnología el desafío principal es aumentar o reducir la escala de una reacción biológica sin que se generen cambios en la productividad del proceso, o que de ser así, se pueda explicar claramente la razón de dicha reducción (Lydersen *et al.*, 1994).

El propósito del escalamiento es seleccionar las condiciones de diseño y procedimientos de operación para asegurar que el efecto de las diferentes variables sobre el proceso sean las mismas en unidades de diferente tamaño. El objetivo es, por lo tanto, obtener rendimientos o productividades similares con una calidad del producto similar (Hincapié *et al.*, 2005).

El impacto que sufre el microorganismo en todo el proceso de biotransformación es multifacético, en parte debido a su complejidad como entidad viviente y a la complejidad resultante de las condiciones dentro del biorreactor. En consecuencia, no existen modelos generales para el escalado de fermentaciones que puedan tener en cuenta la enorme diversidad de la biología del organismo relevante. Por lo tanto, el escalado depende de resultados experimentales de estudios de plantas piloto y de laboratorio (Asenjo, 1995).

Por lo general, en el laboratorio se operan matraces agitados (aproximadamente 500 mL) o pequeños fermentadores, donde se buscan nuevos productos, se estudian mecanismos de control y se mejoran las cepas de producción. En la planta piloto (5-5000 L) se estudian efectos de aireación, temperatura y control de pH; en muchos casos los fermentadores cuentan con instrumentos para conectarse a una computadora con el objeto de estudiar la dinámica del cultivo y

de ser posible, establecer un control por retroalimentación. En la planta industrial, los fermentadores de producción (5000 – 400000 L) deben operar siguiendo un calendario fijo; además, se trata de aumentar la productividad (Quintero, 1990).

2.5.1 Criterios de Escalamiento

En la práctica se utilizan varios criterios para efectuar el cambio de escala, todos ellos basados en resultados empíricos, y de esta forma, existen relaciones que resumen los criterios empleados para cambio de escala en tanques agitados por medios mecánicos y las relaciones entre variables de operación y diseño (Quintero, 1990).

Existen diversos criterios de escalamiento, los cuales asignan parámetros que deben mantenerse constantes en cada una de las escalas, entre ellos:

- Requerimientos de potencia (P/V).
- Circulación del líquido (Q/V).
- Velocidad en la punta del impulsor.
- Número de Reynolds.
- Coeficiente de transferencia de oxígeno (KLa)
- Similitud geométrica

En cualquiera de estos casos, se deben tener en cuenta tres aspectos determinantes en la realización del escalamiento (Stanbury, 1995):

- Identificar el parámetro ambiental que resulta principalmente afectado por la aireación y agitación.
- Identificar una variable de proceso que afecte la anterior variable.
- Calcular el valor de la variable de proceso que al utilizarse en gran escala permita obtener las mismas condiciones ambientales que en pequeña escala.

Dentro de los parámetros ambientales que pueden ser afectados por la aireación y agitación se encuentran la disponibilidad de los nutrientes, el pH, la temperatura, los esfuerzos cortantes, la concentración de O₂ disuelto y la producción de espuma. Sin embargo, se ha encontrado que los más importantes parámetros ambientales que se ven afectados por la agitación y aireación en la mayor parte de la fermentación son la concentración de oxígeno y los esfuerzos cortantes (Stanbury, 1995).

Los parámetros mencionados anteriormente están relacionados unos con otros y también con las variables del sistema, pero en diferentes formas. Por lo tanto, se pueden obtener resultados disímiles para el mismo problema dependiendo del criterio empleado. Por esta razón, siempre se debe tratar de seleccionar como base de escalado, la propiedad de transporte que más crítica sea para el desempeño del bioproceso (Asenjo, 1995).

2.5.2 Coeficiente Volumétrico de Transferencia de Masa

Dado que usualmente en las fermentaciones aerobias desarrolladas a gran escala, el mayor problema es el suministro de oxígeno suficiente desde la fase gaseosa, la mayoría de las veces la magnitud que se mantiene constante en escalado es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno que es transferido de las burbujas de gas a los microorganismos (Asenjo, 1995). Para implementar esta

estrategia de escalamiento, es necesario encontrar una correlación entre el coeficiente de transferencia de masa y las variables de operación, las propiedades del fluido y las variables geométricas. Seleccionar una correlación particular para el K_La significa asumir que la correlación aplicará para cualquier condición del proceso desarrollado y se debe tener en cuenta que el transporte de masa debe ser gobernado por el mismo mecanismo en todas las escalas (Hubbard *et al.*, 1994).

El término K_La es conocido como el coeficiente volumétrico de transferencia de masa, cuyas unidades están dadas como recíproco del tiempo (h^{-1}) (Lydersen *et al.*, 1994), depende tanto de variables de operación como la agitación y la aireación, así como de las características físicas del caldo fermentativo, tales como la composición del medio, la viscosidad, cantidad de antiespumante presente, entre otros.

Varios autores han establecido correlaciones experimentales para el valor de K_La como función de la agitación, la aireación y la potencia por unidad de volumen, que se pueden aplicar a varios niveles como se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Correlaciones para $K_L a$ en fluidos de baja viscosidad.

Correlación	Sistema	Volumen de Operación (L)	Referencia
$K_L a = K \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.95} (v_s)^{0.67}$	Agua con lones	10; 768; 500	Cooper <i>et al</i> (1944)
$K_L a = K \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.4} (v_s)^{0.5} (N)^{0.5}$	Agua con lones	11; 27	Richards (1961)
$K_L a = K \left(\frac{P_g}{V} \right)^{2.72} (v_s)^{0.11}$	Fermentación de Levaduras	20000	Hospodka <i>et al</i> (1964)
$K_L a = K (N)^{4.3} (D)^{0.24} (v_s)^{0.5} 10^{-3}$	Agua con lones	100; 550; 1000	Fukuda <i>et al</i> (1968)
$K_L a = K \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.4} (v_s)^{0.2}$	Agua	20 - 2600	Van't Riet (1979)
$K_L a = K \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.7} (v_s)^{0.2}$	Agua con lones	2-4000	Van't Riet (1979)
$K_L a = K (T)^{0.2} (H)^{-1.3} (N)^{1.5} (D)^{2.3} (v_s)^{0.6}$	Agua con lones	100-100000	Asa & Kono (1968)
$K_L a = K \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.69} (v_s)^{0.49}$	Agua con lones	17	Salvador (1984)

Fuente: Duarte, 1995

Así, se puede observar la proporcionalidad directa que existe entre el coeficiente de transferencia de masa y la agitación y la aireación; al aumentar cada una de estas variables también aumenta el coeficiente de transferencia (Treybal, 1988).

2.5.3 El Reactor Biológico

La función principal de un reactor biológico es la de proporcionar un ambiente controlado para el crecimiento de microorganismos, con el fin de obtener un producto deseado. Algunas de las consideraciones básicas en el proceso de

diseño, dimensionamiento y construcción de un reactor biológico son las siguientes (Stanbury, 1995):

- El cuerpo del reactor debe estar habilitado para ser operado de manera aséptica durante cierto periodo de tiempo, debe ser confiable a largo plazo y cumplir con los requerimientos de contención, para evitar la contaminación del medio de cultivo con agentes externos y evitar el escape de células viables fuera del reactor (Stanbury, 1995).
- Debe suministrarse una agitación y aireación adecuadas de acuerdo con los requerimientos metabólicos de los microorganismos, sin que el mezclado llegue a hacerles daño (Barrera, 2004).
- El consumo de potencia se debe mantener en los niveles mínimos posibles, para disminuir los costos energéticos (Barrera, 2004).
- Se debe contar con sistemas de control de temperatura, pH, entre otros; para garantizar un ambiente óptimo para el crecimiento de los microorganismos.
- Se requiere un sistema de muestreo del medio; para monitorear el desarrollo de la fermentación.
- Las pérdidas por evaporación no pueden ser excesivas.
- El reactor se debe diseñar para que requiera la mínima cantidad de intervención durante su operación, obtención de productos, limpieza y mantenimiento, para evitar contaminación (Barrera, 2004).
- En condiciones ideales, el reactor debe ser apropiado para cierta variedad de procesos, lo cual se ve restringido por los requerimientos de contención; según

la clasificación asignada por la *European Federation of Biotechnology* (EFB), se designa un nivel de contención apropiado para microorganismos utilizados en procesos industriales (Stanbury, 1995).

- El cuerpo del reactor debe tener una superficie interna libre de rugosidades; para evitar la acumulación de células o medio de cultivo que puedan generar contaminación.
- El reactor debe tener una geometría similar a todos los recipientes de mayor y menor tamaño en la planta piloto o en la planta para facilitar su escalamiento.
- Los materiales utilizados deben ser económicos y resistentes a las condiciones de operación como altas temperaturas, presiones y agitación, entre otras.
- Debe contarse con todos los servicios industriales requeridos como agua, vapor, aire y energía eléctrica.

El tamaño del reactor biológico para el cultivo de microorganismos depende de la cantidad de materia prima necesaria para una corrida, la cual se estima según planeación y cálculos previos. Estos estimativos tienen en cuenta la concentración de producto, los procesos de purificación y las pérdidas que pueden ocurrir durante la formulación, las operaciones de llenado, durante los muestreos para el control de calidad o en el monitoreo del proceso (Lydersen *et al.*, 1994). Normalmente, sólo el 70 – 80% del volumen del reactor es ocupado por el líquido; esto permite un adecuado espacio en la parte superior para liberar gotas provenientes del gas saturado y para ubicar cualquier espuma creada.

El biorreactor consta de dos recipientes sometidos a presión. El primero es el tanque donde se llevarán a cabo los procesos de fermentación y transferencia de masa y el segundo es la chaqueta por la cual se realizarán los procesos de

transferencia de calor y la esterilización (calentamiento sobre 120 °C) (Lydersen *et al.*, 1994).

El fermentador, es un recipiente sometido a presión externa ya que sus paredes externas están en contacto con el agua de refrigeración, calefacción o vapor saturado para esterilización. La chaqueta por el contrario, estará sometida a estos fluidos internamente por lo cual se utilizan criterios de diseño de presión interna.

La tasa de transferencia de calor está relacionada directamente con el área de la superficie de contacto, el gradiente de temperatura del medio y el material de construcción. El enfriamiento o calentamiento se lleva a cabo con fluidos como vapor, agua caliente o fría, o soluciones de etilenglicol, los cuales son transportados en circuitos. El área de superficie de contacto y la caída de presión en el sistema deben ser optimizadas para cada tanque y fluidos específicos (Lydersen *et al.*, 1994).

La reología de las fermentaciones a menudo cambia en un cultivo discontinuo, más aún cuando se trata de materiales que muestran un comportamiento reológico no – newtoniano, tal como los almidones, polisacáridos extracelulares y cultivos celulares que contengan células en suspensión o pellets. Los cambios en la reología del cultivo son causados por el cambio de varias propiedades como: concentración celular, morfología, flexibilidad y deformidad de las células, presión osmótica del fluido y velocidad de agitación. Por esta razón, el mezclado es una de las operaciones más importantes en los bioprocesos, pues crea un ambiente óptimo para la fermentación, provee a la célula acceso a todo el sustrato incluyendo el oxígeno en cultivos aerobios y promueve la transferencia de calor desde o hacia el líquido (Doran, 1999).

El mezclado generalmente se lleva a cabo en tanques agitados, los cuales son de forma cilíndrica y con las esquinas redondeadas o anguladas para eliminar zonas

de estancado. El mezclado es realizado por impelentes generalmente ubicados en el centro del tanque con respecto al diámetro de la tapa y a una altura igual al diámetro del tanque, según las relaciones estándares existentes.. La selección del impelente depende de varios factores, en especial de la viscosidad del líquido y la sensibilidad del sistema al estrés de corte (Duarte, 1998). Para fluidos de viscosidades bajas a medias se recomienda utilizar impelentes tipo propeller o disco de hoja plana; de estos dos, el impelente usado con mayor frecuencia en la industria es el disco de 6 hojas planas conocido también como turbina Rushton (Doran, 1999). En general este tipo de agitadores por poseer las hojas planas en un ángulo de 90°, genera un patrón de flujo radial desde el impelente hasta la pared del tanque donde se divide en dos corrientes, una que fluye hacia arriba y otra hacia el fondo del tanque (Walas, 1990).

En el mezclado los baffles también juegan un papel importante. Estos son segmentos de metal ubicados contra la pared del tanque y separados igualmente para reducir la formación de un vórtice y un remolino que abarque todo el líquido. El baffle óptimo depende del diseño del impelente y de la viscosidad del fluido y están en el orden de 1/10 – 1/12 del diámetro del tanque (Walas, 1990).

Una parte importante del fermentador es el sistema de aireación, pues cuando se trata con un microorganismo aerobio, se debe asegurar que la aireación sea adecuada. Para esto se utilizan dos instalaciones separadas: un difusor y un impulsor. El difusor es un instrumento con una serie de agujeros en un aro de metal o una boquilla, a través de los cuales se puede hacer pasar hasta el fermentador aire esterilizado por filtración a gran presión. El aire entra en el fermentador en forma de diminutas burbujas, a través de las cuales el oxígeno pasa por difusión al líquido (Madigan *et al.*, 2000).

En bioprocesos, el acero inoxidable 316L es generalmente el material más utilizado para la construcción de biorreactores. Esta elección se basa en criterios

como la compatibilidad con una amplia gama de microorganismos, la alta resistencia a la corrosión, ya que el uso de productos ácidos con alto contenido de cloruro, compuestos de limpieza y el vapor puro pueden causar una corrosión considerable de los equipos. El acero inoxidable es resistente a la corrosión debido a una microscópica capa fina de óxido de cromo (Lydersen *et al.*, 1994). Otro criterio importante es la vida útil del equipo.

Tanto la superficie externa del tanque que está expuesta al medio ambiente como la interna que está en contacto con el producto deben tener un acabado de superficie definido que permita un lavado higiénico y fácil. La calidad y suavidad de la superficie tratada mecánicamente está definida por la medida aritmética de la rugosidad (Ra). Calidades de Ra de aproximadamente 0.6 μm (acabado espejo) es el mínimo generalmente aceptado y aprobado en biotecnología (Lydersen *et al.*, 1994).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 UBICACIÓN

Las fermentaciones, pruebas y análisis correspondientes a este trabajo, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT en la ciudad de Medellín.

Las encuestas para la identificación del mercado potencial y los ensayos de efectividad se llevaron a cabo en fincas ganaderas proveedoras de Alquería S.A. en los municipios de Siberia, Chía, Tocancipá, Cota, Tabio, Tenjo y Cajicá, ubicados en el departamento de Cundinamarca.

3.2 LOS MICROORGANISMOS

Se utilizó una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*.

La cepa de referencia de *Lactobacillus casei* empleada para el desarrollo del proyecto está identificada con el número ATCC (American Type Culture Collection) 7469 y es propiedad del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Eafit.

3.3. REACTIVOS

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de *S. cerevisiae* se preparó con base en melaza de caña con adición de fuentes de nitrógeno.

Para *L. casei* el medio de cultivo empleado para la activación de la cepa es el medio MRS de Man, Rogosa y Sharpe. En la Tabla 5 se puede observar la composición del medio MRS para *Lactobacillus*.

Tabla 4. Composición del medio MRS

Compuesto	Composición (g/L)
Peptona caseína	10
Extracto de carne	8
Extracto de Levadura	4
Glucosa	20
Tween 80	1
Fosfato Dipotásico	2
Acetato de Sodio	5
Citrato de Amonio	2
Sulfato de Magnesio	0.2
Sulfato de Manganeso	0.05
Agar	13

Todos los medios de cultivo cuya fuente de carbono era la melaza, fueron filtrados mediante el uso de una bomba de vacío para filtración BÜCHI con el fin de retirar los sólidos presentes en la melaza, posteriormente fueron esterilizados en el autoclave horizontal EASTERN modelo EA -620 T a 120° C a 15 psig por 15 minutos.

3.4 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Saccharomyces cerevisiae*.

3.4.1 Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó en erlenmeyers de 800 ml con 200 ml de medio a pH inicial de 6.0, los cuales fueron esterilizados en el autoclave horizontal EASTERN modelo EA -620 T a 120° C por 15 minutos, e inoculados con 0.2 g de

S. cerevisiae provenientes del producto comercial. Los erlenmeyers fueron llevados a un agitador orbital NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC C1 Classic Series de 1 plg a una temperatura de 28° C durante 24 horas.

3.4.2 Producción de biomasa de *S. cerevisiae*

La producción de biomasa de *S. cerevisiae* se llevó a cabo en un biorreactor BIOENGINEERING CH 8636 (figura 6) con 1.8 litros del medio de cultivo MU y 200 ml de inóculo durante 12 horas, tomando muestras cada dos horas por duplicado.

Figura 6. Montaje de fermentación para *S. cerevisiae*



3.4.2.1 Condiciones del cultivo. Los procesos de fermentación se realizaron a una velocidad de agitación de 200 rpm, empleando dos agitadores tipo Rushton de 6 paletas planas, a un pH inicial de 6.0, a una velocidad de aireación de 1 vvm y variando para cada experimento la temperatura. La densidad de inóculo empleada para el proceso correspondió al 10% del volumen del ensayo, la edad del inóculo era de 12 horas y la densidad celular de 1.592 g/L que correspondía a una absorbancia de 0.207.

3.4.2.2 Curva de calibración. Se realizó una curva de calibración con el fin de determinar la relación entre la biomasa en g/L y la absorbancia de la siguiente manera: un ml de muestra se adicionó a un tubo falcon de 15 ml y fue centrifugado a 4500 rpm, 4 °C, por 20 min. Posteriormente se realizaron dos lavados con agua desionizada con centrifugación intermedia a las mismas condiciones antes mencionadas. El pellet fue resuspendido en 10 ml de agua desionizada y se leyó la absorbancia a 600 nm. A partir de la muestra se realizaron diluciones para obtener concentraciones conocidas mediante la ecuación 1:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \text{ Ecuación 1:}$$

Donde:

C₁: concentración inicial (absorbancia),

V₁: volumen requerido.

C₂: concentración final

V₂: volumen final (10 ml)

Se leyó la absorbancia de cada una de las diluciones por triplicado, y se adicionó 1 ml de cada una a un eppendorf previamente secado, rotulado y pesado, se centrifugó a las mismas condiciones descritas anteriormente, el sobrenadante fue descartado y los eppendorf llevados a un horno a 50°C durante 24h. Las muestras fueron pesadas y se computó la biomasa mediante la ecuación 2:

$$C_x = \frac{X_2 - X_1}{V_L} \text{ Ecuación 2:}$$

Donde:

C_x: concentración de la biomasa seca [g/L].

X₁: peso de los eppendorf vacíos y secos [g]

X_2 : peso de los eppendorf con biomasa seca o pellet [g]

V_L : volumen del cultivo [L]

Finalmente se realizó una gráfica de peso seco vs. absorbancia y se linealizó para obtener la ecuación de trabajo.

3.4.2.3 Medición de biomasa. Para la medición de la biomasa se tomó un ml de muestra y se adicionó a un tubo falcon de 15 ml y fue centrifugado a 4500 rpm, 4 °C, por 20 min. Luego se realizaron dos lavados con agua desionizada con centrifugación intermedia a las mismas condiciones antes mencionadas. El pellet fue resuspendido en 10 ml de agua desionizada y se leyó la absorbancia a 600 nm.

3.4.2.4 Cuantificación de consumo de sustrato. La cuantificación de azúcares totales se llevó a cabo por el método DNS (Ácido 3,5 dinitro salicílico) (Miller, 1959). Para llevar a cabo el procedimiento se empleó el sobrenadante obtenido después de centrifugar la muestra. (Ver anexo A)

3.5 INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AIREACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Lactobacillus casei*.

3.5.1 Activación de la cepa

La activación de la cepa de *L. casei* proveniente de la ATCC se realizó repicando la cepa en medio MRS y luego raspando toda la biomasa y adicionándola en unos crioviales con perlas. Luego una de estas perlas fue repicada en caja petri con medio MRS para obtener las cepas de trabajo.

3.5.2 Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó en erlenmeyers de 250 ml con 20 ml de medio a pH inicial de 6.4, los cuales fueron esterilizados a 120° C por 15 minutos, e inoculados con 2 asadas aproximadamente de *L. casei*, provenientes de la cepa de trabajo. Los frascos se llevaron a un agitador orbital de 1 plg a 150 rpm y 40° C por 48 horas.

3.5.3 Producción de biomasa de *L. casei*

La producción de biomasa de *L. casei* se llevó a cabo en un biorreactor BIOENGINEERING CH 8636 con 1.8 litros del medio de cultivo y 200 ml de inóculo de 48 horas de edad, con una concentración de 0.750 g/L que corresponde a una absorbancia de 0.078. la fermentación se llevó a cabo durante 30 horas, tomando muestras cada dos horas por duplicado.

3.5.3.1 Condiciones del cultivo. Los procesos de biotransformación se realizaron a una temperatura de 37° C, velocidad de agitación de 150 rpm, empleando dos agitadores tipo Rushton y variando para cada experimento el flujo de aire. La densidad de inóculo empleada para el proceso correspondió al 10% del volumen del ensayo que fue obtenida del preinóculo.

3.5.3.2 Curva de calibración. Se realizó una curva de calibración con el fin de determinar la relación entre la biomasa en g/L y la absorbancia de la siguiente manera: un ml de muestra se adicionó a un tubo eppendorf de 1.5 ml y fue centrifugado a 1400 rpm, 4 °C, por 20 min. Posteriormente se realizó un lavado con HCl 1N y otro con agua desionizada con centrifugación intermedia a las mismas condiciones antes mencionadas. El pellet fue resuspendido en 1 ml de agua desionizada y se leyó la absorbancia a 600 nm. A partir de la muestra se realizaron diluciones para obtener concentraciones conocidas mediante la ecuación 2. Se realizó el mismo procedimiento para el secado de las muestras que

para *S. cerevisiae* y finalmente se realizó una gráfica de peso seco vs. absorbancia y se linealizó para obtener la ecuación de trabajo.

La curva de calibración para *L. casei* se realizó de manera similar a la realizada para *S. cerevisiae*. Difieren en que para *L. casei* el primer lavado se llevó a cabo con HCL 1N con el fin de eliminar el exceso de carbonato de calcio de las muestras y así poder obtener una medición de la absorbancia más precisa, también en que no se realizó una dilución 1:10 sino que se leyó la absorbancia de la muestra (1 ml) directamente.

3.5.3.3 Medición de biomasa. Para la medición de la biomasa se tomó un ml de muestra y se adicionó a un tubo eppendorf de 2 ml y fue centrifugado a 14000 rpm, 4 °C, por 20 min. Luego se realizó un lavado con HCl 1N y otro con agua desionizada con centrifugación intermedia a las mismas condiciones antes mencionadas. El pellet fue resuspendido en 1 ml de agua desionizada y se leyó la absorbancia a 600 nm.

3.5.3.4 Cuantificación de consumo de sustrato. La cuantificación de azúcares totales se llevó a cabo por el método DNS (Ácido 3,5 dinitro salicílico) (Miller, 1959). Para llevar a cabo el procedimiento se empleó el sobrenadante obtenido después de centrifugar la muestra. (Ver Anexo A)

3.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Para las fermentaciones de cada uno de los microorganismos se desarrolló un diseño de experimentos unifactorial ANOVA con un nivel de confianza del 95%, el cual sirve para comparar si los valores de biomasa y rendimiento obtenidos al variar la temperatura y la velocidad de aireación en cada uno de los casos, son similares o significativamente diferentes.

Para *S. cerevisiae* el factor de estudio fue la temperatura, la cual se evaluó a 25, 30 y 35° C. Para *L. casei* el factor estudiado fue la velocidad de agitación, cuyos valores fueron de 0.5, 0.7 y 0.9 vvm. Las variables de respuesta fueron: concentración de biomasa a las 12 horas para *S. cerevisiae* y a las 30 horas para *L. casei*, rendimiento de sustrato en biomasa y velocidad específica de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) para cada uno de los microorganismos.

Se plantearon las siguientes hipótesis:

- Ho (Hipótesis nula): No existen diferencias significativas en cuanto al crecimiento y rendimiento, para las diferentes condiciones a evaluar.
- H (Hipótesis alternativa): Los valores de las medias para los tratamientos son diferentes.

3.7 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

3.7.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento

Para determinar la cinética de crecimiento de los microorganismos se ajustó el crecimiento a un modelo exponencial (ecuación 3) y se graficó el Ln de la concentración celular (Ln X) contra el tiempo (t) de la fase exponencial. La pendiente de esta línea corresponde a la máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) y el intercepto al logaritmo natural de la concentración celular en el tiempo cero (Ln x_0)

$$X = X_0 e^{\mu_{m\acute{a}x} t} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidad específica máxima de crecimiento, h^{-1}

X = concentración celular, g/L

X₀ = concentración celular en cada momento, g/L

3.7.2 Determinación de los Rendimientos

El rendimiento observado de sustrato en biomasa ($Y'_{X/S}$), se determinó empleando la ecuación 4:

$$Y'_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \text{ Ecuación 4}$$

Para tal fin se graficaron los datos de biomasa vs consumo de sustrato obtenidos de la fermentación de cada microorganismo. Los puntos de la gráfica se aproximaron a una línea recta siendo la pendiente el rendimiento observado de sustrato en biomasa.

3.8 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE MASA (K_La)

Para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_La) de los procesos de biotransformación se empleó el método dinámico (Ver Anexo B), el cual se basa en el balance de oxígeno de un estado dinámico (Dorán, 1999).

3.9 ESCALADO

La función objetivo del escalamiento fue mantener constante la concentración de biomasa en los bioreactores de 20 L, 200 L y 2000 L. El escalado se realizó con similitud geométrica teniendo en cuenta las relaciones estándares reportadas por Dorán (1999), y por medio del coeficiente de transferencia de masa (k_La)

constante. Con el fin de determinar todos los parámetros de operación del proceso (agitación, aireación, potencia, etc.) se tuvieron en cuenta las relaciones reportados por Quintero (1990) y tabuladas en la tabla 7.

Tabla 5. Diferentes criterios para cambio de escala en tanques geoméricamente similares, con medio y propiedades físicas constantes ($N_{Re} > 10^4$, $N_P = \text{constante}^*$)

<i>Criterio</i>	<i>Relación</i>	<i>Relación</i>
Potencia por unidad de volumen constante	$P/V \propto (N^3 D^2)$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{2/3}$
Flujo proveniente del impulsor por unidad de volumen constante	$Q/V \propto N$	$\frac{P_1}{P_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^5$
Velocidad tangencial constante	$\pi ND = K'$	$\frac{N_1}{N_2} = \frac{D_1}{D_2}$
N_{Re} similar	$N_{Re} \propto ND^2$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^2$
Tiempo de mezclado igual	$f = t_M N^{2/3} D^{-1/6}$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{1/4}$
K_L constante	$K_L \propto (ND)^{2\alpha-1}$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{\frac{2\alpha-1}{\alpha}}$
$K_L a$ constante	$K_L a \propto \left(\frac{P}{D^3}\right)^\alpha$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{2/3}$
$K_L a$ constante	$K_L a \propto \left(\frac{P}{D^3}\right)^\alpha V_s^\beta$	$\frac{N_1 \alpha_1}{N_2 \alpha_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{\beta/3} \left(\frac{D_2 \alpha_2}{D_1 \alpha_1}\right)^{2/3}$

* N_P = número de potencia

Fuente: Quintero, 1990

3.10 ANÁLISIS DE PREFACTIBILIDAD

3.10.1 Estudio de Mercado

Se realizó un análisis de la demanda, la oferta, la competencia, la distribución y los volúmenes de producción necesarios.

Para la identificación del mercado potencial se visitaron varias fincas ganaderas proveedoras de Alquilería S.A. con el fin de registrar la problemática de moscas en cada una de ellas, y realizar una encuesta (Ver Anexo C) a sus propietarios o trabajadores con el fin de obtener información sobre la población de moscas en los hatos y su control.

Las encuestas fueron analizadas mediante la cuantificación porcentual de cada una de las preguntas planteadas.

3.10.2 Estudio Técnico

Según los criterios de escalamiento calculados, y los resultados obtenidos en el laboratorio, se realizó el diseño conceptual del proceso, que consta principalmente de los diagramas general, de bloques y de flujo del proceso de producción del bioinsecticida. Así como de la selección y descripción de los equipos.

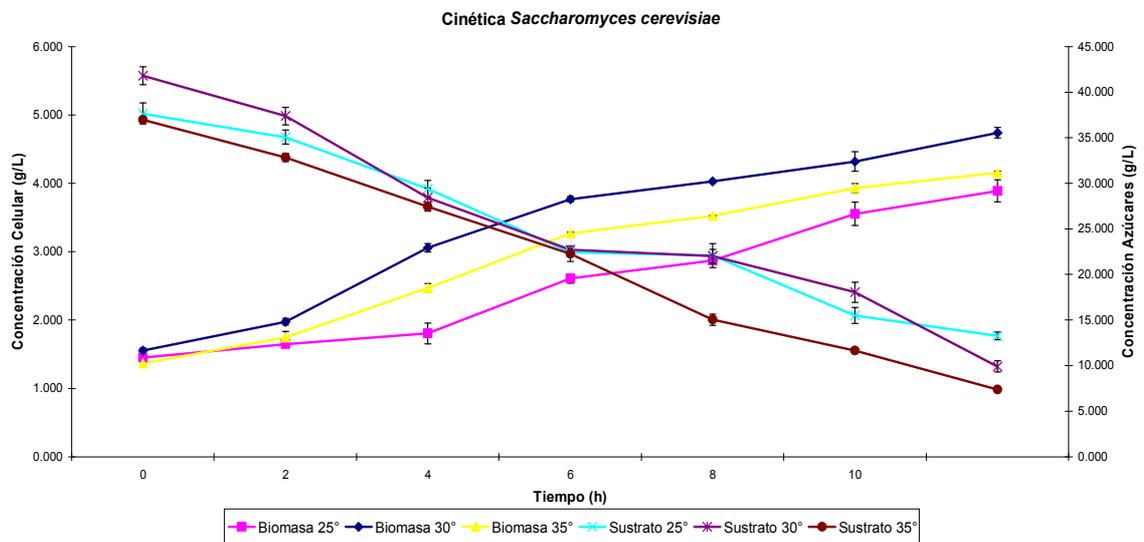
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PROCESOS FERMENTATIVOS

4.1.1 Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los resultados para cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato de *S. cerevisiae* se cuantificaron en g/L. Dichos datos en promedio con su respectivo valor de error estándar se muestran en el anexo D y en el gráfico 1.

Gráfico 1. Crecimiento celular y consumo de sustrato de *S. cerevisiae* a diferentes temperaturas.



*Barras verticales: error estándar.

En el gráfico 1 se puede observar el efecto de la temperatura en la concentración de biomasa durante las fermentaciones que se llevaron a cabo a 1 vvm de aireación y 200 rpm de velocidad de agitación. Del gráfico se puede apreciar que

para las condiciones mencionadas la mayor concentración de biomasa es de 4.741 g/L obtenida a una temperatura de 30° C en 12 horas. Se observa que la temperatura es un factor determinante en la producción de biomasa para *S. cerevisiae* ya que a las temperaturas estudiadas la producción de biomasa fue variable. (Corroborado por el análisis estadístico posterior).

Como puede observarse en el gráfico 1, cada una de las curvas de biomasa muestra una fase lag de 2 horas aproximadamente, seguida de 10 horas de fase log.

Del gráfico 1 puede observarse la disminución en la concentración de azúcares reductores en el sustrato. Debido al consumo de la fuente de carbono demandada por el microorganismo, la concentración de azúcar disminuyó cerca del 80%, valor que indica que el sustrato fue consumido para la producción de biomasa, para la formación de productos como el etanol y para el mantenimiento (control de pH, movilidad de la célula, gasto energético para transporte de nutrientes, etc.). Lo ideal para la producción de biomasa es obtener bajos consumos de sustrato para la formación de productos.

Los resultados obtenidos a partir de algunas investigaciones realizadas para la producción de biomasa de *S. cerevisiae* en cultivo batch se muestran en la tabla 8.

Tabla 6. Resultados de investigaciones realizadas por otros autores para la producción de biomasa de *S. cerevisiae*.

<i>Microorganismo</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Condiciones de cultivo</i>				<i>Rendimiento</i>	<i>Referencia</i>
		Temperatura	pH	Agitación	Aireación		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LBGH 1022	Medio sintético con glucosa	30 °C	5.5	900 rpm	0.5 vvm	3 g/L	Beck <i>et al.</i> , (1968)
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4111	YM líquido	35 °C	6	600 rpm	aireador dispersador de microburbujas	3.5 g/L	Hensirisak (1997),
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4111	YM líquido	35 °C	6	476 rpm	aireador dispersador de microburbujas	6 g/L	Parakulsuksatid (2000),
<i>Saccharomyces spp</i>	YM modificado con melaza	25 °C	4.5	150 rpm	-----*	4,76 mg/mL.	Manovacia y Moreno (2005)
<i>Saccharomyces spp</i>	YM modificado con melaza	28 °C	4	200 rpm	1 vvm	19.48 g/L	Durango (2007)

* Las fermentaciones se llevaron a cabo en frascos agitados.

La máxima cantidad de biomasa que se obtuvo en esta investigación fue de 4.741 g/L, si se compara este valor con los reportados en la literatura para la producción de *S. cerevisiae* en cultivos tipo batch, se puede decir que tiene un comportamiento similar a condiciones de cultivo parecidas. Si se tiene en cuenta la naturaleza del medio de cultivo empleado en este trabajo, la producción de biomasa es muy buena, pues se trata de un medio de cultivo complejo y no comercial, que no contiene todos los nutrientes como carbono, fuente de nitrógeno (sulfato amónico, urea o aminoácidos), Biotina (vitamina B₈ o vitamina H), sales y elementos traza (Livense y Lim, 1982), necesarios para el buen crecimiento y desarrollo de *S. cerevisiae*, pero que para las necesidades del proceso resulta ser el adecuado por su bajo costo.

4.1.1.1 Parámetros Cinéticos para *Saccharomyces cerevisiae*. En la Tabla 9 se muestra los rendimientos de biomasa en sustrato observados ($Y'_{x/s}$), así como la velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) obtenidos para cada tratamiento.

Tabla 7. Rendimientos de Biomasa en sustrato, concentración máxima de biomasa y velocidades específicas de crecimiento para *S. cerevisiae*.

Tratamiento	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$Y'_{x/s}$ (g biomasa /g sustrato)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})
25° C	3.890	0.1004	0.0885
30° C	4.741	0.1077	0.0927
35° C	4.146	0.096	0.0947

Después de observar los resultados presentados en la Tabla 9, es importante recordar que los rendimientos observados no son necesariamente constantes a lo largo del cultivo discontinuo; en algunos casos exhiben dependencia significativa de los parámetros medio ambientales tales como la concentración de sustrato y la velocidad de crecimiento.

De la Tabla 9, se puede observar que el mayor rendimiento de biomasa en sustrato se obtiene para el tratamiento en el que se presenta una mayor producción de biomasa, siendo la fermentación que se realizó a una temperatura de 30° C, 200 rpm y 1 vvm la que mejor rendimiento arroja.

Según Verduyn *et al.* (1991), un rendimiento de 0.49 gr biomasa/gr glucosa que se encuentra a velocidades específicas de crecimiento entre 0.10 y 0.25 h^{-1} es un valor típico para cultivos respirativos de *S. cerevisiae*. Una ligera disminución es probable, debido a un incremento en la contribución de energía de mantenimiento requerida por todos los procesos (Pirt, 1965). Esta puede ser una de las razones por las cuales se presentaron valores de rendimiento tan bajos para este ensayo o

porque se produjo una ligera cantidad de etanol, la cual se pudo percibir por el olor del caldo de fermentación.

Se ha demostrado que cerca del valor crítico de oxígeno disuelto, la tasa específica de crecimiento de los microorganismos aeróbicos es constante (Shuler y Kargi, 1992). Lo que comprueba que la mayor diferencia que se presenta es debida a la dispersión del oxígeno en el medio de cultivo que provoca un incremento en la concentración de oxígeno disuelto que se traduce en un leve aumento de la concentración celular.

A velocidades de crecimiento específicas cercanas a 0.20 h^{-1} Frick *et al.* (2005) determinaron que el metabolismo de *S. cerevisiae* es totalmente oxidativo, indicando la ausencia de productos de la fermentación y un alto rendimiento de biomasa, a valores mayores se favorece la formación de etanol y acetato. Para una $\mu = 0.30 \text{ h}^{-1}$, cerca del 25 % de la glucosa se emplea en fermentación, indicando que el metabolismo sigue siendo principalmente respirativo, mientras que a velocidades superiores una cantidad mayor de glucosa se involucra en vías fermentativas.

4.1.1.2 Análisis Estadístico para *Saccharomyces cerevisiae*. El análisis estadístico para *S. cerevisiae* fue realizado empleando el programa STATGRAPHICS Plus 5.1, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el laboratorio, con los valores de los duplicados para cada fermentación. El nivel de confianza empleado para llevar a cabo el análisis fue de 95%.

Los resultados obtenidos con la ayuda del software STATGRAPHICS Plus 5.1 se muestran en el anexo F.

- **Análisis de varianza para la producción de biomasa**

El valor P es de 0.0259, como este valor es menor que el valor de significancia ($\alpha = 0.05$) se puede decir que la temperatura tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la producción de biomasa en el tiempo.

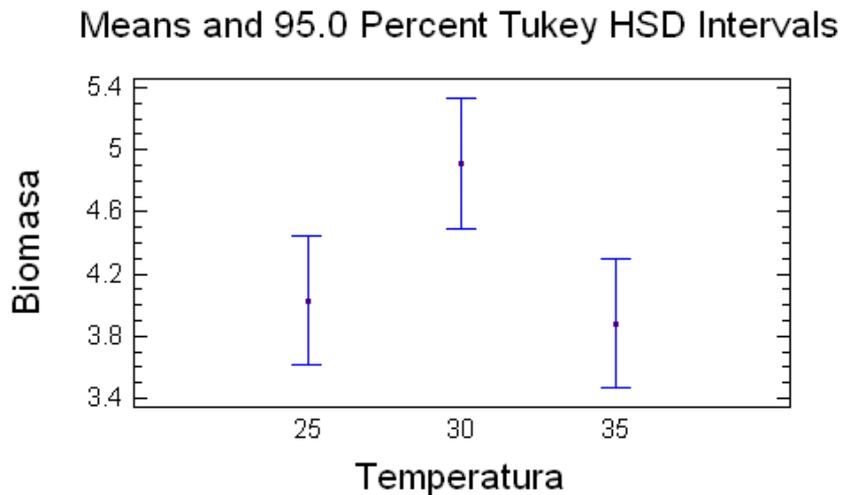
- **Análisis de rangos múltiples para la producción de biomasa**

Debido a que el tratamiento empleado influye significativamente en la producción de biomasa, es necesario realizar un análisis de rangos múltiples que permita determinar el tratamiento con el cual se obtiene mayor producción de biomasa respecto al tiempo.

De acuerdo con los resultados (ver anexo F) la producción de biomasa es significativamente mayor cuando las fermentaciones son realizadas a 30 °C. El estudio presentó un comportamiento homogéneo entre 25 °C - 35 °C, y entre 25 °C – 30°C y 30 °C – 35°C se presentan diferencias significativas.

A continuación se muestra la gráfica dada por el software STATGRAPHICS Plus 5.1, utilizando el método de Tuckey para la media de producción de biomasa, con su respectiva desviación, para las tres condiciones de fermentación trabajadas.

Gráfico 2. Producción media de Biomasa para *S. cerevisiae*.



- **Análisis de varianza para el rendimiento de biomasa en sustrato y la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$)**

Dado que para ambos parámetros el valor P es mayor que el valor de significancia ($\alpha = 0.05$), 0.5639 para el rendimiento de biomasa en sustrato y 0.8509 para la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$), se puede decir que la temperatura no es un factor estadísticamente relevante para estos dos parámetros.

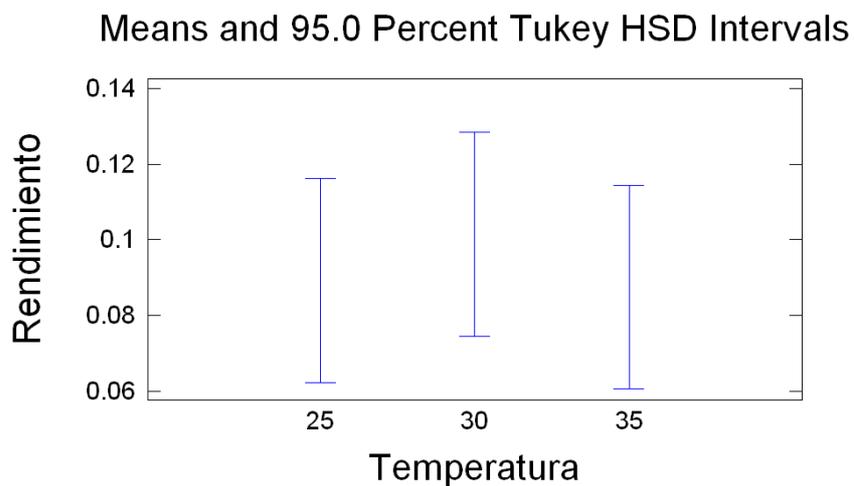
- **Análisis de rangos múltiples para el rendimiento de biomasa en sustrato**

Este análisis muestra que todos los grupos son homogéneos, a cualquier temperatura a la cual se lleven a cabo las fermentaciones se obtendrán valores similares de $Y'x/s$, es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Según los resultados (ver anexo F), el máximo rendimiento de biomasa en sustrato se obtiene a 30 °C y el valor de la media es 0.1015. Se empleó el modelo de Tuckey, en la gráfica 3 se muestra la media de rendimiento de biomasa en

sustrato, con su respectiva desviación, para las tres condiciones de fermentación trabajadas.

Gráfico 3. Rendimiento de biomasa en sustrato medio para *S. cerevisiae*.

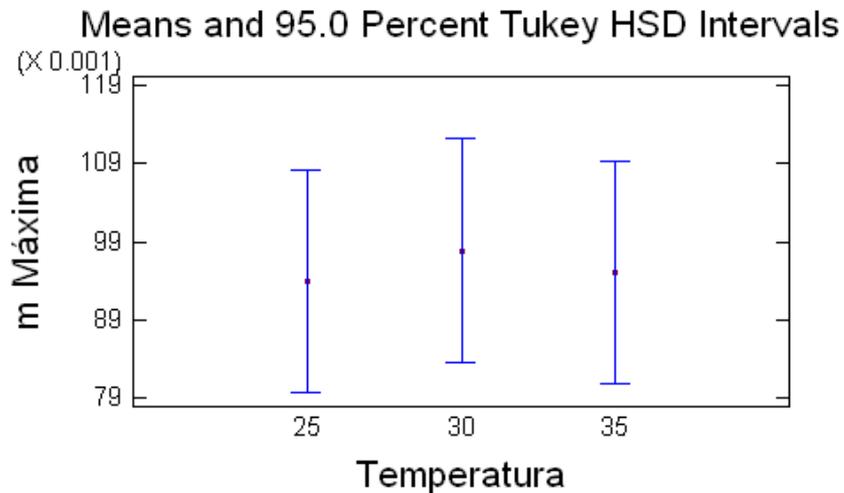


- **Análisis de rangos múltiples para la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$)**

Para $\mu_{\text{máx}}$ no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, ya que el análisis muestra que todos los grupos son homogéneos. El máximo valor de ($\mu_{\text{máx}}$) se obtiene a 30 °C y el valor de la media es 0.09785.

En la gráfica 4 se muestra la media de ($\mu_{\text{máx}}$), con su respectiva desviación, para las tres condiciones de fermentación trabajadas.

Gráfico 4. Velocidad específica media para *S. cerevisiae*.

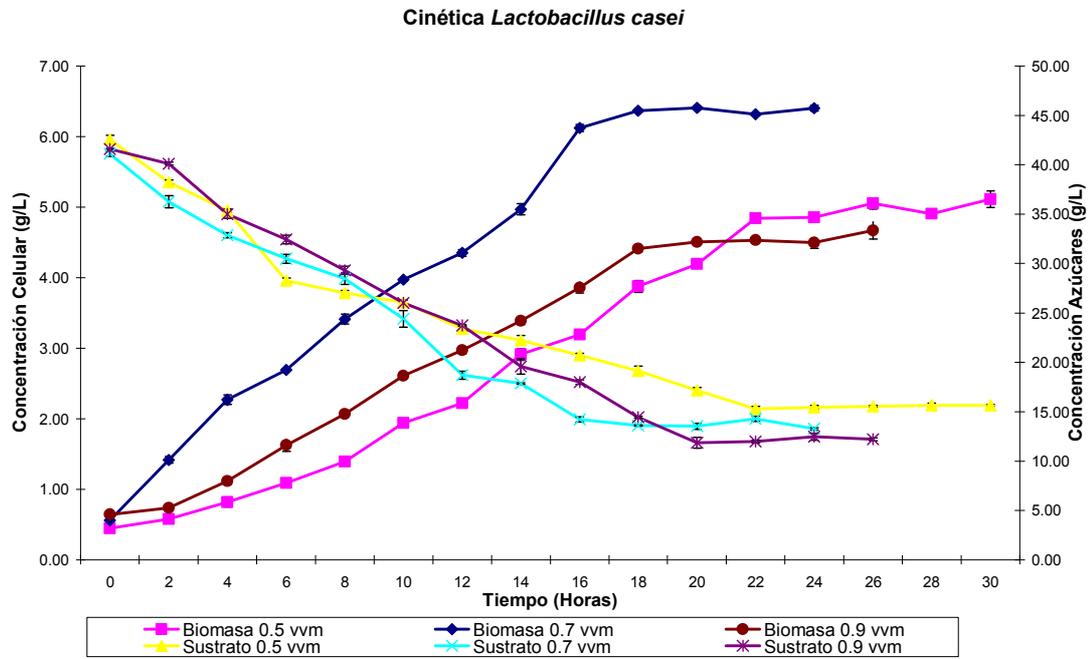


4.1.2 Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato de *Lactobacillus casei*.

Para *Lactobacillus casei* los resultados de cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato se cuantificaron en g/L. En el anexo E se muestran los datos en promedio con sus respectivos valores de error estándar (E).

En el gráfico 5 se muestra la influencia de la velocidad de aireación, sobre el consumo de sustrato y crecimiento de la biomasa para *L. casei* respecto al tiempo de fermentación.

Gráfico 5. Crecimiento celular y consumo de sustrato de *L. casei* a diferentes velocidades de aireación.



*Barras verticales: error estándar.

En el gráfico 5 se puede observar el efecto de la velocidad de aireación en la producción de biomasa durante las fermentaciones que se llevaron a cabo a una velocidad de agitación de 150 rpm y a una temperatura de 37° C. Existen diferencias entre los tratamientos en cuanto a la producción de biomasa más no en cuanto al consumo de sustrato, según el gráfico 5 (corroborado en el análisis estadístico posterior). Para las condiciones mencionadas la mayor concentración de biomasa es de 6.410 g/L obtenida a una velocidad de aireación de 0.7 vvm en 20 horas de fermentación.

Como puede observarse en la gráfica 5, ninguna de las curvas presenta fase lag, posteriormente se observa la fase log de aproximadamente 18 horas de duración, seguida de 4 horas de fase estacionaria. Se aprecia una gran diferencia en el

comportamiento entre los tratamientos, la cual se debe principalmente a la concentración de biomasa. La concentración inicial en promedio es de 0.497 g/L y se alcanzan concentraciones finales alrededor de 5.49 g/L, estos resultados son confiables ya que presentan un error máximo de 0.0854 y se corroboran con el análisis estadístico.

Por tratarse de un microorganismo microaerófilico la velocidad de aireación es un factor determinante en la producción de biomasa para *L. casei*, ya que a menores velocidades de aireación la producción de biomasa puede ser más baja e incrementar la producción de ácido láctico, lo que se debe controlar para la formulación del bioinsecticida.

La concentración de azúcar se reduce en un 67%, lo que indica que el sustrato fue consumido para la producción de biomasa, para la formación de ácido láctico y para el mantenimiento celular.

La evolución de las fermentaciones durante el desarrollo de cada una de ellas resulta consistente con la aparición de la fase estacionaria en las curvas de crecimiento.

En el trabajo realizado por Edgar Mauricio Vargas *et al.*, 2004, se obtuvo una concentración de 5.5 g/L de biomasa de *Lactobacillus spp.* En un reactor biológico Bioflo 3000 (New Brunswick Scientific), empleando MRS como medio de cultivo, a una temperatura de 37° C, pH a 5.5, 1.48 vvm de aireación y una velocidad de agitación de 150 rpm. Parra 2004, realizó cultivos de *Lactobacillus* aislados de yogurt en un medio de cultivo no lácteo a base de melaza y condiciones similares a Vargas *et al.*, 2004 pero a una velocidad de aireación de 1.5 vvm, obteniendo una concentración celular de 5.8 g/L en un tiempo de fermentación de 24 horas.

La concentración de biomasa de *L. casei* obtenida en el presente trabajo es superior a la reportada en la literatura para fermentaciones cuyo objetivo es la producción de biomasa y no la producción de ácido láctico. Es importante destacar que el medio de cultivo empleado en esta investigación es el formulado para la elaboración del bioinsecticida y no contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de *Lactobacillus*, los cuales son: una fuente de carbono, fósforo, azufre, potasio y magnesio, entre otros.

4.1.2.1 Parámetros Cinéticos para *Lactobacillus casei*. Los rendimientos de biomasa en sustrato observados ($Y'_{x/s}$) para *L. casei*, así como la velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) obtenidos para cada tratamiento de muestran en la tabla 10.

Tabla 8. Rendimientos de biomasa en sustrato, concentración celular y velocidades específicas de crecimiento para *L. casei*

Tratamiento	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$Y'_{x/s}$ (g biomasa /g sustrato)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)
0.5 vvm	5.113	0.286	0.0917
0.7 vvm	6.404	0.2072	0.0792
0.9 vvm	4.671	0.1552	0.0926

De la Tabla 10, se puede observar que el mayor rendimiento de biomasa en sustrato en este caso no coincide con el tratamiento en el que se presenta una mayor producción de biomasa. El mayor rendimiento (0.2860 g/g) fue arrojado por la fermentación que se llevó a cabo a una velocidad de aireación de 0.5 vvm, 37° C y 150 rpm, mientras que la mayor producción de biomasa se obtuvo a las mismas condiciones de temperatura y velocidad de agitación pero a una aireación de 0.7 vvm. La incidencia de la velocidad de aireación sobre el rendimiento en la producción de biomasa de *L. casei* se puede observar en el análisis estadístico.

Los rendimientos obtenidos son bajos, lo que quiere decir que el consumo de sustrato se debe a la producción de ácido láctico en una pequeña proporción, lo que puede causar inhibición en la producción de biomasa.

Se observa que la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) para *L. casei* presenta valores cercanos aunque se haya trabajado a diferentes condiciones de aireación, lo que indica que éste parámetro cinético es independiente del factor de estudio. En el análisis estadístico posterior se corrobora este enunciado.

4.1.2.2 Análisis Estadístico para *Lactobacillus casei*. Para *L. casei* el análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa STATGRAPHICS Plus 5.1, se tuvo en cuenta los resultados obtenidos en el laboratorio y sus duplicados para cada fermentación. El nivel de confianza empleado para llevar a cabo el análisis fue de 95%.

Los resultados obtenidos con la ayuda del software STATGRAPHICS Plus 5.1 se muestran en el anexo G.

- **Análisis de varianza para la producción de biomasa**

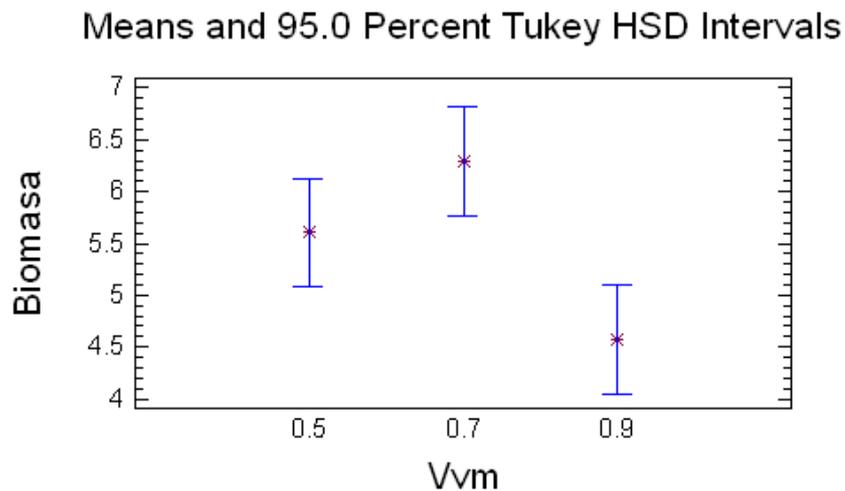
Para las tres fermentaciones el valor P obtenido para la producción de biomasa es de 0.0144, como este valor es menor que el valor de significancia ($\alpha = 0.05$) se puede decir que la velocidad de aireación tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la producción de biomasa en el tiempo.

- **Análisis de rangos múltiples para la producción de biomasa**

Como el tratamiento empleado influye significativamente en la producción de biomasa, es necesario realizar un análisis de rangos múltiples que permita determinar el tratamiento con el cual se obtiene mayor producción de biomasa, respecto al tiempo.

La producción de biomasa es significativamente mayor cuando las fermentaciones son realizadas a una velocidad de aireación de 0.7 vvm, cuyo valor de la media es de 6.2925. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de 0.5 vvm – 0.9 vvm y 0.7 vvm - 0.9 vvm, mientras que entre 0.5 vvm y 0.7 vvm existe homogeneidad. La gráfica 6 muestra las medias obtenidas por el modelo de Tukey para la producción de biomasa, con su respectiva desviación, para las tres condiciones de fermentación trabajadas.

Gráfico 6. Producción media de biomasa para *L. casei*.



- **Análisis de varianza para el rendimiento de biomasa en sustrato y para la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$)**

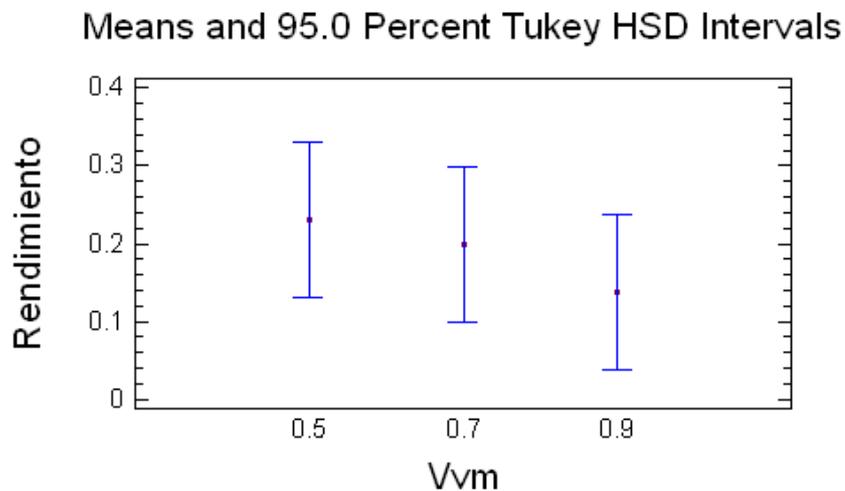
El valor P es mayor que el valor de significancia en ambos casos, 0.2815 para el rendimiento de biomasa en sustrato y de 0.3771 para la velocidad específica de crecimiento, por lo que la velocidad de aireación no es un factor relevante estadísticamente para estos dos factores.

- **Análisis de rangos múltiples para el rendimiento de biomasa en sustrato**

Para cualquier valor de velocidad de aireación a la cual se lleven a cabo las fermentaciones se obtendrán valores similares de $Y'_{x/s}$. Gracias al análisis de rangos múltiples se puede observar que los tres tratamientos son homogéneos, es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

El máximo rendimiento de biomasa en sustrato se obtiene a 0.5 vvm y el valor de la media es 0.3208, seguido por el tratamiento de 0.7 vvm cuya media es 0.1994 y es la velocidad de aireación a la cual se presenta mayor producción de biomasa. En la gráfica 7 se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, lo que quiere decir, según el modelo de Tuckey que los tratamientos son homogéneos

Gráfico 7. Rendimiento de biomasa en sustrato medio para *L. casei*.

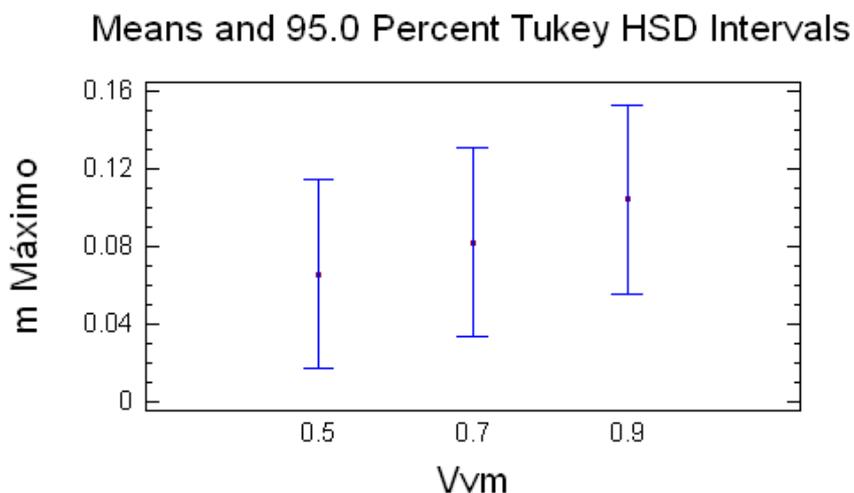


- **Análisis de rangos múltiples para la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{máx}$)**

No existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para $\mu_{máx}$, ya que el análisis muestra que todos los grupos son homogéneos. El máximo valor de ($\mu_{máx}$) se obtiene a 0.9 vvm y el valor de la media es 0.10425. Se puede observar que la mayor velocidad específica de crecimiento no corresponde al tratamiento que presenta una mayor producción de biomasa, que en este caso es a 0.7 vvm cuya media es 0.082.

En la gráfica 8 se muestra la media de ($\mu_{máx}$), con su respectiva desviación, para las tres condiciones de fermentación trabajadas, empleando el método de Tuckey.

Gráfico 8. Velocidad específica media para *L. casei*.



4.2 ANÁLISIS DE PREFACTIBILIDAD

4.2.1 Estudio de mercado

4.2.1.1 Descripción del producto. El insecticida biológico elaborado a partir de *S. cerevisiae* y *L.casei*, se comercializará como un líquido color ámbar (amarillento), olor a fermentado y pH de 3.5-4.5.

4.2.1.2 Usos y aplicaciones del producto. Este producto puede ser utilizado como insecticida para el control biológico de la mosca de establo *Stomoxys calcitrans* en hatos lecheros.

El producto debe ser aplicado por aspersión en las áreas que presentan proliferación de moscas en una dosis de 10 L de bioinsecticida por hectárea cada 8 días.

4.2.1.3 Características del producto. Es un producto natural de gran utilidad para el sector ganadero, de bajo costo, comparado con otros productos

bioinsecticidas que existen en el mercado a nivel nacional e internacional. Resulta atractivo para los ganaderos del país ya que es un producto efectivo para el control de *S. calcitrans* en establos, potreros y salas de ordeño; adicionalmente es de fácil manejo y aplicación.

4.2.1.4 Identificación del mercado

- **Resultados encuestas**

Se visitaron 30 fincas ganaderas para realizar la encuesta planteada en la metodología para identificar el mercado potencial del insecticida biológico. Los resultados sobre la población y control de moscas en los hatos lecheros, realizadas a los ganaderos proveedores de Alquería S.A. se muestran a continuación.

Tabla 9. Resultados encuestas realizadas a los ganaderos proveedores de Alquería S.A.

Pregunta	Cantidad / porcentaje			
	Confinamiento	Establo		Potrero
	1 / 3.33%		29 / 96.67%	
Tipo de Ordeño	Manual		Mecánico	
	1 / 3.33%		29 / 96.67%	
Posee problemas de moscas?	Si		No	
	24 / 96.67%		6 / 3.33%	
En qué lugares?	Potrero	Establo	Sala de Ordeño	Otro
	18 / 60.00%	11 / 36.67%	6 / 20.00%	3 / 10.00%
La población es:	Abundante		Moderada	Nula
	12 / 40.00%		12 / 40.00%	6 / 20.00%
Considera usted que la presencia de mosca influye en la productividad del hato?	Si		No	
	22 / 73.33%		8 / 26.67%	
Controla la mosca con algún producto?	Si		No	
	23 / 76.67%		7 / 23.33%	
Cuánto le cuesta al mes?	50000-100000	100000-500000	500000-1000000	más de 1000000
	27 / 90.00%	3 / 10.00%	0 / 0.00%	0 / 0.00%
Estaría dispuesto a emplear un producto que controle las moscas no sólo en los animales sino también en superficies de establos, salas de ordeño	Si		No	
	29 / 96.67%		1 / 3.33%	

Los resultados de las encuestas realizadas a los ganaderos, demuestran que existe una gran necesidad de controlar las moscas en los hatos lecheros, ya que en la mayoría de las fincas visitadas la presencia de éste díptero era inminente e interfería en la productividad del hato. Así mismo las encuestas revelaron que uno de los lugares donde se presenta mayor población de moscas es en los potreros, lugar en el cual se genera una alta cantidad de materia orgánica; como residuos de alimentos, pasto y estiércol, material propicio para la reproducción de las moscas. Otro aspecto importante es el cambio de mentalidad que tienen los ganaderos para evitar el uso de productos químicos y emplear en su lugar productos de origen biológico; obviamente sin que los costos de éstos últimos sean elevados, es decir que compitan con los productos químicos tanto en efectividad como en precio; en este aspecto el bioinsecticida cumpliría con estos

requisitos ya que los costos de producción son muy bajos y controla eficazmente la población de moscas en los hatos lecheros.

- **Políticas relacionadas con bioinsecticidas**

Los bioinsecticidas tienen numerosas restricciones de reglamentación como los productos químicos, ya que se trata de productos de uso agrícola y lo que se pretende es prevenir y minimizar daños a la salud humana, a la sanidad agropecuaria y al ambiente, bajo las condiciones autorizadas y facilitar el comercio nacional e internacional.

Los productos de origen biológico como los bioinsecticidas hacen parte de un grupo denominado bioinsumos que a su vez se clasifican en agentes microbiales, según la Resolución N° 00375 del 27 de febrero de 2004 del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Para Agentes biológicos para el control de plagas, se debe realizar un análisis de la composición garantizada del producto, que indique el contenido en cuanto a género y especie del (los) organismo (s) presente (s) por unidad de peso, volumen o según sea el tipo de formulación o presentación del producto. En dicha resolución también se establecen los controles para la producción, importación, registro y control de bioinsumos y extractos vegetales de uso agrícola en Colombia.

Para la producción de bioinsumos es necesario que la empresa que desee producir este tipo de productos se registre ante el ICA. Asimismo, deberá adjuntar certificado de existencia y representación legal expedido por la Cámara de Comercio; copia del permiso del Ministerio del Medio Ambiente; concepto sanitario emitido por la autoridad de vigilancia y control sanitario del Ministerio de Protección; información sobre el laboratorio con que cuenta la empresa para el control de calidad; planos de las instalaciones y descripción de los procesos de elaboración (ICA-Normatividad, 2007). A nivel mundial la reglamentación para la

producción de bioinsumos puede diferir según las políticas establecidas por cada gobierno.

Por la inversión que requiere el desarrollo de este tipo de productos, es necesario proteger el conocimiento generado. Para esto, además del registro del producto comercial, se debe usar la protección por patente de invención. Los organismos genéticamente modificados pueden ser patentados, pero la mayoría de los ACB (Agentes de Control Biológico) utilizados generalmente son “nativos”, es decir, se usan en el estado como se encuentran en la naturaleza. Estos microorganismos pertenecen a cada nación y no pueden ser patentados (Fernández, 2002). Se puede reclamar la propiedad intelectual por uso de un microorganismo, por la combinación de microorganismos o productos naturales en una fórmula o reclamar los derechos de autor sobre una marca identificada con uno o más productos de origen biológico.

4.2.1.6 Competencia. Actualmente en Colombia existen numerosas empresas dedicadas a la producción y comercialización de bioinsumos, mas no específicamente de bioinsecticidas para el control de *S. calcitrans*; motivo por el cual se puede decir que el producto no posee competencia directa a nivel nacional. Asimismo, en el mercado internacional existen productos de origen biológico elaborados por la empresa japonesa EMRO® (Effective Microorganisms Reaserch Organization) quien tiene en Colombia desde el año 2000 a la Fundación de asesorías para el sector rural (Fundases) (Fundases, 2007) como único productor y distribuidor autorizado de su producto EM- inóculo microbial para compostaje. Se tiene información sobre algunos productos biológicos comercializados en nuestro país (tabla 12), la empresa que los produce y el ingrediente activo que los compone:

Tabla 10. Productos a base de Bioinsumos Comercializados en Colombia

<i>Nombre comercial</i>	<i>Nombre empresa</i>	<i>Ingrediente activo</i>	<i>Tipo de producto</i>
AGROGUARD	Live Systems Technology S.A. LST S.A.	<i>Trichoderma harzianum</i>	Agente microbial
BACILLUS AGROGEN	WP Agroquímicos Genéricos	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Agente microbial
BIOEXPERT	Live Systems Technology S.A. LST S.A.	<i>Beauveria bassiana</i>	Agente microbial
EM - INOCULO MICROBIAL PARA COMPOSTAJE	Fundases - Fundación de asesorías para el sector rural	<i>Lactobacilos casei;</i> <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae;</i> <i>Rhodopseudomona</i> <i>palustris</i>	Inóculo microbial para compostaje
TURILAV WP	Laboratorios Laverlam S.A. Empresa	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Agente microbial
TURIVEC	Colombiana de Productos Veterinarios Vecol S.A.	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Agente microbial
TRICHO D	WP Orius Biotecnología	<i>Trichoderma harzianum</i>	Agente microbial

Fuente: Agronet, 2006

4.2.1.7 Formas de venta y distribución. Para la incursión en el mercado del insecticida biológico se debe realizar una reunión con los diferentes clientes potenciales que pudieran ser usuarios del producto, presentación en la cual se lleva a cabo la exposición de resultados de la aplicación del producto en el campo. Es de vital importancia vincular a los veterinarios o asistentes técnicos para que conozcan los resultados de la aplicación del producto y se afilien y recomienden su uso.

Una vez se tenga esto, el proceso es iniciar la oferta de venta, y dependiendo el costo y la inversión de introducción del producto al mercado se debe ampliar el muestreo en fincas representativas de cada zona para ganar credibilidad y conocimiento por parte de los ganaderos, administradores de fincas y asistentes

técnicos. Posteriormente se debe pensar en ampliar el mercado en el canal de distribución que son los almacenes agropecuarios especializados, para el ingreso a este canal se debe realizar las presentaciones de resultados a los dueños y administradores de estos almacenes, y establecer los márgenes de intermediación y fijación de precios al usuario final, acorde con los costos y márgenes definidos para el producto una vez analizado el mercado y los productos de la competencia. Normalmente la condición o limitante impuesta por estos comercializadores, es que los usuarios pidan el producto antes de ellos tenerlo en el punto de venta, situación que se esperaría estuviera sucediendo con el trabajo previo realizado en las fincas de Alquería S.A.

4.2.1.8 Características de los consumidores actuales y potenciales. Los ganaderos colombianos ante la llegada al país de productos cárnicos y lácteos del exterior, han comenzado a implementar nuevas técnicas de producción para ser más competentes en cuanto a calidad y cantidad de sus productos. Un factor influyente en la cantidad de leche producida es la infestación por moscas que presentan los animales mientras se encuentran en pastoreo, en los establos y en las salas de ordeño; motivo por el cual se han implementado sistemas de control de estas plagas, lo que denota el interés y el compromiso de los ganaderos por optimizar las condiciones ambientales en las que viven los animales para mejorar directamente la producción de leche.

Los productos comercializados en Colombia actualmente son en su mayoría insecticidas químicos, factor que preocupa a los ganaderos por su acción sobre la salud de los animales y el efecto residual que se puede presentar en los productos, también por el cuidado que se debe tener en cuanto a la manipulación y aplicación ya que dichos productos son altamente tóxicos.

Debido a los efectos nocivos producidos por los insecticidas químicos, el ganadero de hoy reconoce la importancia de cuidar la salud e higiene de su hato de forma

natural. La utilización de productos de origen biológico en el sector agropecuario constituye una de las tendencias más significativas en el mercado de bioinsumos en el país.

4.2.1.9 Análisis DOFA. Es necesario identificar las fortalezas y debilidades de la organización (tabla 13), así como las oportunidades y amenazas que ofrece el entorno, ya que esto permite determinar los aspectos que se deben mejorar, caracterizar la competencia y el medio en el cual se desarrollará el proyecto (Zapata y Puerta, 2006).

Tabla 11 Análisis DOFA

FORTALEZAS	DEBILIDADES
<p>Alquería S.A. es una empresa posicionada en el mercado que posee un numeroso grupo de ganaderos proveedores de leche, es decir, ya tiene consolidado gran parte del mercado del bioinsecticida.</p> <p>La empresa cuenta con el conocimiento necesario y con un grupo de personas competentes en las diferentes áreas que estarían involucradas en la producción, venta y distribución del insecticida biológico.</p> <p>La formulación del producto garantiza un control rápido y eficiente de la mosca <i>S. calcitrans</i> en hatos lecheros.</p>	<p>La inversión inicial requerida para el proyecto es significativamente alta, puesto que los equipos requeridos además de ser muy costosos, algunos deben ser importados.</p>

OPORTUNIDADES	AMENAZAS
<p>Los ganaderos en Colombia están tomando conciencia de la importancia del uso de bioinsecticidas, esto se evidencia en el crecimiento de la demanda de los productos de origen biológico.</p> <p>Los bioinsumos por ser productos de origen natural, resultan atractivos para los ganaderos colombianos ya que mejoran la calidad y cantidad de sus productos sin afectar la salud de los animales ni contaminar el ambiente.</p> <p>Los precios de los productos biológicos existentes en el mercado, son significativamente mayores a los que tendrá este producto.</p>	<p>Para obtener el registro ICA es necesario cumplir con todos los requisitos establecidos para ello, y Alquería S.A. aún no completa todas las exigencias, por lo que la competencia podría tomar ventaja en el mercado de los bioinsecticidas.</p> <p>Por tratarse de un producto nuevo en el mercado es necesario invertir en publicidad, así como en capacitación y asesorías a los ganaderos y distribuidores.</p>

4.2.1.10 Proyección de la demanda. Para realizar la proyección de la demanda se tomará como base la identificación del mercado potencial y los ensayos de campo, rendimiento y efectividad realizados con anterioridad por Alquería S.A. La proyección de la demanda no se basará en la producción anual de la competencia ya que no se conocen datos, pues la industria de los bioinsumos en Colombia es todavía incipiente (Ramirez, 2000). Se estima que en un principio se podría obtener una demanda de 137,34 gal/año (520.000 L/año). Además, se prevé que el crecimiento anual será del 10%.

4.2.1.11 Análisis de la oferta. El producto que se tiene es nuevo, por lo tanto no puede hacerse un análisis detallado de la oferta. Sin embargo, es posible tomar como referencia el comportamiento en el mercado de empresas que elaboran

productos de origen biológico como EMRO, la cual en sólo 13 años de operación ha ingresado exitosamente en el mercado de bioinsumos de 180 países en el mundo (Emrousa, 2007). En Colombia el mercado de los bioinsumos es aún un mercado primitivo, pues según cifras de un estudio realizado por la oficina de Biocomercio Sostenible del Instituto Alexander von Humboldt, nada más el mercado de pesticidas químicos en el país alcanza los US\$ 600 millones anuales que comparados con los US\$ 6 millones del mercado de bioinsumos y extractos de plantas, da muestra del extenso camino que falta por recorrer en este tema (Proexport, 2005). Motivo por el cual se puede inferir que las empresas que se dedican a la producción de bioinsumos como los insecticidas biológicos deben ir aumentando la oferta de sus productos.

4.2.1.12 Análisis de precios. Los siguientes factores van a afectar el precio del producto:

- Costo de Producción (variación de volumen de producción).
- Variación en la disponibilidad y costo de la materia prima.
- Costo de transporte (destino del producto).

Políticas que pueden afectar el precio (Zapata y Puerta, 2006):

- Impuestos y aranceles.
- Incentivos gubernamentales por ser una empresa que invierte en investigación e innovación tecnológica.

4.2.2 Estudio técnico

4.2.2.1 Capacidad de producción. La demanda del producto fue estimada en 137,34 gal/año en el estudio de mercado. Sin embargo, la capacidad de producción de la planta se fijó en 164,807 gal/año, previendo un crecimiento de la demanda.

4.2.2.2 Diseño conceptual del proceso

- **Escalado de los biorreactores**

En el escalado que se lleva a cabo, se pretende pasar de un biorreactor a escala de laboratorio con un volumen de trabajo de 2 L, a dos biorreactores independientes para cada uno de los microorganismos estudiados a escala piloto de 2000 L, es decir, escalar el volumen del líquido 1000 veces. Este procedimiento se realiza sin guardar similitud geométrica, pues el biorreactor a escala de laboratorio BIOENGINEERING CH 8636 que es propiedad del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Eafit no conserva las relaciones geométricas reportadas en la literatura y sobre las cuales se basan las gráficas de potencia necesarias para el cálculo del K_{La} .

En la práctica es difícil mantener la geometría similar para realizar un escalamiento basado en métodos de análisis dimensional, además, estudios han demostrado la ventaja de escalar sin obedecer a la similitud geométrica (Quintero, 1990).

Se utilizó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno como criterio de escalamiento (K_{La}), ya que dicho parámetro es crítico para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus casei*, microorganismos aerobio y aerobio facultativo, respectivamente; así que en ambos casos el K_{La} es

fundamental para mantener el crecimiento y la productividad de los microorganismos a gran escala.

Medición de $K_L a$. El $K_L a$ fue medido mediante el método dinámico (Ver Anexo B). Esta medición se realizó por triplicado para cada uno de los microorganismos. Para *S. cerevisiae* el valor obtenido fue 25.56 h^{-1} , a 200 rpm de velocidad de agitación y 1 vvm de aireación. Para *L. casei* el $K_L a$ fue hallado a 150 rpm de agitación y 0.7 vvm de aireación y el valor obtenido fue 26.64 h^{-1} .

Determinación de los parámetros de escalado. De las correlaciones para $K_L a$ reportadas en la literatura, se escogió la publicada en 1979 por Van't Riet (ecuación 4), ya que es la más acorde con el sistema estudiado por tratarse de un medio de cultivo con iones. (Duarte, 1995):

$$K_L a = 0.002 \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.7} (v_s)^{0.2} \quad \text{Ecuación 4}$$

Para poder llevar a cabo este escalado, es necesario conocer algunos datos de operación y de diseño del biorreactor a escala de laboratorio, las propiedades de los medios de cultivo y datos básicos de diseño de los biorreactores a escala piloto. En las Tablas 14, 15 y 16 se presenta esta información en el orden antes mencionado.

Tabla 12. Datos de operación y diseño del biorreactor a escala de laboratorio (2L) para *S. cerevisiae* y *L. casei*

D (m)	0.12
D _i (m)	0.045
H _i (m)	0.167
W _b (m)	0.0457
N _b	4
W _i (m)	0.0122
L _i (m)	0.015
n _i (rpm)	200
n _i (rps)	3.3333
Q (m ³ /s)	3.3333 * 10 ⁻⁵
V (m ³)	2*10 ⁻³
W _i / D _i	0.2711
D/ D _i	2.6667
H _i / D _i	3.7111
v _s <i>S. cerevisiae</i> (m/s)	2.9473*10 ⁻³
v _s <i>L. casei</i> (m/s)	2.0631*10 ⁻³
K _L a experimental <i>S. cerevisiae</i> (s ⁻¹)	0.0071
K _L a experimental <i>L. casei</i> (s ⁻¹)	0.0074

Tabla 13. Propiedades del medio de cultivo para *S. cerevisiae* y *L. casei*

Densidad ρ (g/cm ³)	1.0168
Viscosidad μ (cP)	1.2642

Tabla 14. Datos de diseño de los biorreactores de 20L, 200L y 2000L

Parámetro	Biorreactor de 20L	Biorreactor de 200L	Biorreactor de 2000L
D (m)	0.2942	0.6338	1.3656
D _i (m)	0.0981	0.2113	0.4552
H _L (m)	0.2942	0.6338	1.3656
H _i (m)	0.0981	0.2113	0.4552
L _i (m)	0.0245	0.0528	0.1138
W _b (m)	0.0294	0.0634	0.1366
W _i (m)	0.0196	0.0423	0.0910
N _b	4	4	4
H _i /D	1	1	1
D _i / D	0.3333	0.3328	0.3331

Fuente: Dorán, 1999.

Donde: (ver Figura 7):

D = Diámetro interno del reactor

H_L = Altura del líquido

L_i = ancho del impeler

W_i = alto del impeler

D_i = Diámetro del impulsor

W_b = Ancho del baffle

N_b = Número de baffles

F_g = Flujo de aire

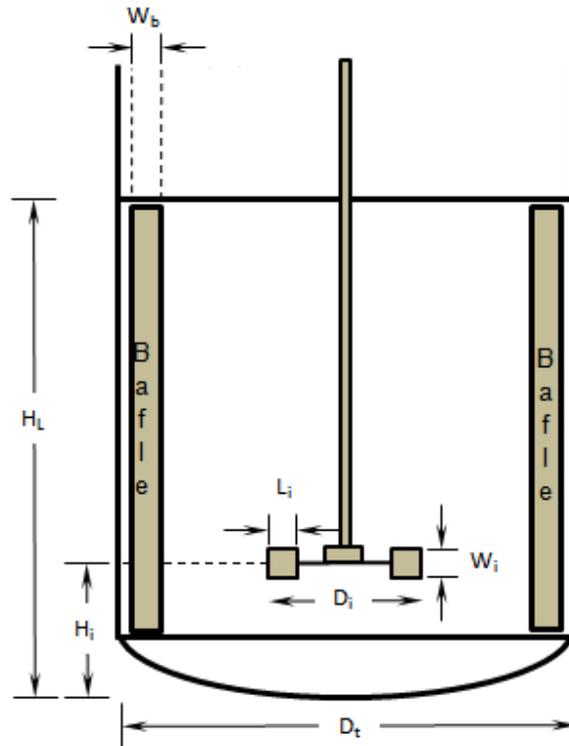
H_i = Altura del fondo del reactor al impeler

V_s = Velocidad de ascenso de la burbuja

V = Volumen de trabajo en el reactor

K_La = Coeficiente volumétrico de transferencia de masa

Figura 7. Dimensiones para un tanque agitado



Fuente: Walas, 1990.

Después de tener esta información, se lleva a cabo el proceso de escalado de cada uno de los biorreactores de la siguiente manera:

Cálculo del caudal del aire (F_A)

$$F_A = QV$$

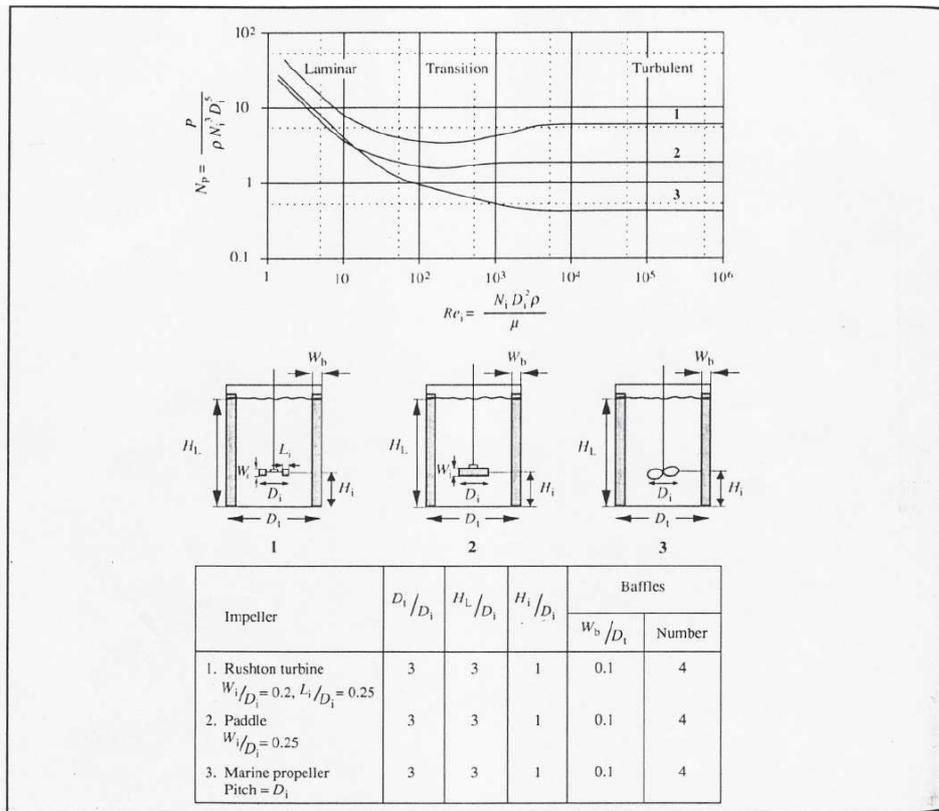
Cálculo del número de Reynolds (Re) (Dorán, 1999)

$$Re = \frac{n_i D_i \rho}{\mu}$$

Obtención y corrección del número de potencia (N_p)

Para la obtención del número de potencia se utiliza el gráfico que se encuentra en el libro *Bioprocess Engineering Principles*. Dicho gráfico se presenta en la Figura 8

Figura 8. Relación entre el Reynolds y tres tipos de impulsores



Fuente: Rushton *et al.*, 1950

Cálculo de la potencia entregada al fluido por el agitador sin Aireación (Dorán, 1999)

$$P_0 = N_{pc} * \rho * n_i^3 * D_i^5$$

Factor de corrección para 2 sets de impulsores

$$P = P_0 * \sqrt{2}$$

Cálculo del número de aireación (Na)

$$Na = \frac{Fa}{D_i^3 * N_i}$$

Obtención de la relación entre la potencia gaseada y la no gaseada (Bailey, 1977)

$$\frac{P_g}{P_0} = 0.35 + \frac{0.65}{1 + (16.67)Na}$$

Determinación de los parámetros de operación (Universidad Nacional de Colombia, 2006).

Velocidad de giro del impulsor (n_G):

$$\frac{K_L a_G}{K_L a_P} = \frac{0.002 \left(\frac{P_G}{V_G} \right)^{0.7} (v_{sG})^{0.2}}{0.002 \left(\frac{P_P}{V_P} \right)^{0.7} (v_{sP})^{0.2}} = \left(\frac{n_G^3 D_{iG}^2}{n_P^3 D_{iP}^2} \right)^{0.7} \left(\frac{\frac{4}{\pi} n_G D_{iG}}{\frac{4}{\pi} n_P D_{iP}} \right)^{0.2}$$

$$\left(\frac{n_G}{n_P}\right) = \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}}\right)^{\frac{1.6}{2.3}}$$

Donde:

G = reactor grande

P = Reactor pequeño

Caudal de aire (Q_G):

$$\left(\frac{Q_G}{Q_P}\right) = \left(\frac{n_G}{n_P}\right) \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}}\right)^3$$

Volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm):

$$\frac{\left(\frac{Q}{V}\right)_G}{\left(\frac{Q}{V}\right)_P} = \frac{n_G}{n_P}$$

Potencia por unidad de volumen:

$$\frac{\left(\frac{P}{V}\right)_G}{\left(\frac{P}{V}\right)_P} = \left(\frac{n_G}{n_P}\right)^3 \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}}\right)^2$$

Potencia:

$$\frac{P_G}{P_P} = \left(\frac{n_G}{n_P}\right)^3 \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}}\right)^5$$

Los parámetros obtenidos para cada uno de los biorreactores según las condiciones de operación para cada microorganismo se muestran en las tablas 17 y 18.

Tabla 15. Parámetros de operación de los biorreactores para *S. cerevisie*.

Parámetro	Biorreactor de 2L	Biorreactor de 20L	Biorreactor de 200L	Biorreactor de 2000L
K _L a (h ⁻¹)	25.56	25.56	25.56	25.56
Velocidad de giro (rpm)	200	117.2652	68.7556	40.3132
Caudal de aire (m ³ /s)	3.33E-05	1.9538E-04	1.1453E-03	6.7136E-03
vvm	1.00	0.59	0.34	0.20
Potencia (W)	0.07	0.64	6.39	59.67
Potencia por unidad de volumen (W/m ³)	34.40	32.18	31.93	29.84

Tabla 16. Parámetros de operación de los biorreactores para *L. casei*.

Parámetro	Biorreactor de 2L	Biorreactor de 20L	Biorreactor de 200L	Biorreactor de 2000L
K _L a (h ⁻¹)	26.64	26.64	26.64	26.64
Velocidad de giro (rpm)	150.00	87.95	51.57	30.23
Caudal de aire (m ³ /s)	2.33E-05	1.3676E-04	8.0167E-04	4.6993E-03
vvm	0.70	0.41	0.24	0.14
Potencia (W)	0.03	0.27	2.69	25.17
Potencia por unidad de volumen (W/m ³)	14.51	13.57	13.47	12.59

Es importante destacar que con el fin de verificar si la correlación escogida para K_La representaba correctamente los sistemas, se calcularon los K_La mediante esta correlación para el biorreactor a escala de laboratorio y se compararon con los obtenidos experimentalmente. Para *S. cerevisiae* el valor obtenido fue de 26.72 h⁻¹ y el porcentaje de error entre estos dos valores es del 4.52%, para *L. casei* el valor del K_La fue de 13.60 h⁻¹, cuyo porcentaje de error es de 48.96%

Además, como era de esperarse, habrá un aumento en el consumo de potencia y una disminución en la velocidad de agitación debida al aumento en el tamaño del

equipo empleado para obtener la nueva escala con respecto al anterior. El valor obtenido para el número de Reynolds asegura que el sistema se encontrará en régimen turbulento, la cual es una de las condiciones recomendadas para que exista un buen mezclado.

Teniendo en cuenta que los procesos que se están estudiando son significativamente dependientes del oxígeno y que el parámetro $K_L a$ está directamente relacionado con el suministro de este compuesto al microorganismo, estos resultados sugieren que el $K_L a$ es el mejor criterio de escalado para estos sistemas.

- **Requerimientos del proceso**

Materias Primas. Para la elaboración del insecticida biológico se emplearán las siguientes materias primas:

Fuente de Carbono: Líquido denso y negrozco, constituido por el residuo que permanece en las cubas después de la extracción de la mayor parte de los azúcares de caña por cristalización y centrifugación (Poballe, 2007).

Fuente de nitrógeno: Sólido cristalino y blanco de forma esférica o granular. Sustancia no peligrosa, no tóxica, no cancerígeno ni inflamable (Textos científicos, 2007).

Cepa de *Saccharomyces cerevisiae*: Microorganismo conservado en agar YM sólido a una temperatura de 4° C.

Cepa de *Lactobacillus casei*: Microorganismo conservado en agar MRS sólido a una temperatura de 4° C.

Todas las materias primas cuentan con proveedores a nivel nacional. Para la obtención de la melaza se cuenta con un numeroso grupo de ingenios azucareros en el departamento del Valle del Cauca como Ingenio Central Castilla, Mayagüez, Pichichí, Providencia e Incauca. La urea posiblemente será suministrada por la empresa Abocol y el carbonato de calcio por la empresa Minerales Barios de Colombia LTDA.

Servicios. Los servicios industriales requeridos se presentan a continuación:

Tabla 17. Especificaciones de los servicios industriales requeridos

<i>Servicio industrial</i>	<i>Descripción</i>
Aire comprimido*	Aire seco y presurizado a 2.6 barg
Agua de proceso*	Agua desionizada: Resistividad: 18 MΩ-cm ⁻¹ Conductividad: 0.055 μs-cm ⁻¹ pH: 6.6 – 7 a 22° C
Agua de enfriamiento (cw)**	30° C. la temperatura de retorno no debe ser mayor a 45° C
Vapor de agua**	lps (6.18 bar)
Combustible	Gas
Energía eléctrica	La planta tendrá conexiones de 110, 220 y 440 voltios. Será suministrada por la empresa que provee la energía a Alquería S.A., Codensa.

* (Zapata y Puerta, 2006)

** (Turton *et al*, 2003)

Mano de obra. La elaboración del insecticida biológico se lleva a cabo por baches, es decir, no se trata de un proceso continuo, por lo que sólo se requieren 2 turnos de trabajo de 8 horas cada uno; de 6 a.m. a 2 p.m. y de 2 p.m. a 10 p.m. durante 6 días a la semana, habrá dos personas encargada de vigilar el proceso durante la noche.

En cada turno se debe contar con 6 operarios y un ingeniero de procesos, el personal de apoyo como mecánicos, personal de servicios varios, ventas y distribución, son personas adscritas a las diferentes áreas de Alquería S.A

- **Descripción del proceso.**

El proceso de producción comienza con la preparación de los medios de cultivo para cada uno de los procesos en un tanque mezclador M-101 de 2000 L de capacidad, que opera a una temperatura de 80° C y a 200 rpm de agitación. A este mezclador ingresan la fuente de carbono y el agua desionizada específicamente. Cuando la fuente de carbono está completamente disuelta en el agua, ésta es llevada a los biorreactores R – 201, R – 202, R – 301 y R – 302, según sea el caso. Para *Saccharomyces cerevisiae*, 180 L del medio de cultivo son llevados al R – 201 de 200 L de volumen de trabajo, donde es esterilizado *in situ* con vapor, se adiciona la fuente de nitrógeno y el preinóculo proveniente del laboratorio para dar comienzo al proceso de elaboración del inóculo de trabajo. Posteriormente se hacen pasar 1800 L de medio de cultivo provenientes de M – 101 al biorreactor R – 202 cuyo volumen de trabajo es de 2000 L, donde es esterilizado con vapor, completado con la fuente de nitrógeno y con 200 L de inóculo provenientes de R – 201, para dar inicio al proceso de fermentación.

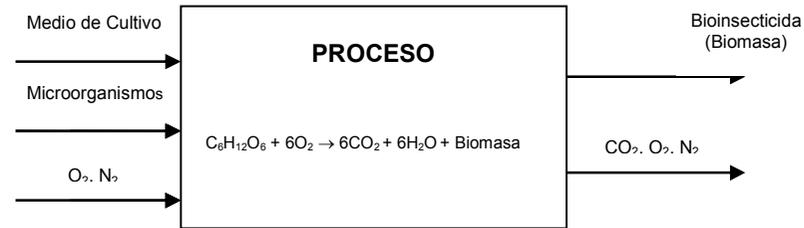
Para *Lactobacillus casei* el procedimiento de preparación de los medios de cultivo es idéntico al descrito para *S. cerevisiae*, se prepara el inóculo en el biorreactor R – 301 de 200 L de capacidad de trabajo y luego éste es llevado al biorreactor R-302 de 2000 L de volumen donde se lleva a cabo la fermentación. En la tabla 20 se presentan las condiciones de operación de los biorreactores R – 301 y R – 302.

La programación de la planta está hecha con el fin de que los dos procesos terminen de forma simultánea en cada uno de los biorreactores R – 202 y R – 302 con el fin de obtener un producto fresco. Una vez hayan finalizado las diferentes

etapas de fermentación, el producto de cada uno de los biorreactores es llevado a un tanque agitado M-102 para ser mezclados, este tanque opera a presión constante y completamente cerrado para evitar cualquier contaminación y a temperatura ambiente, allí se agita la solución a 50 rpm para obtener un producto homogéneo. Luego el producto es empacado en garrafrones de polietileno de 20 L.

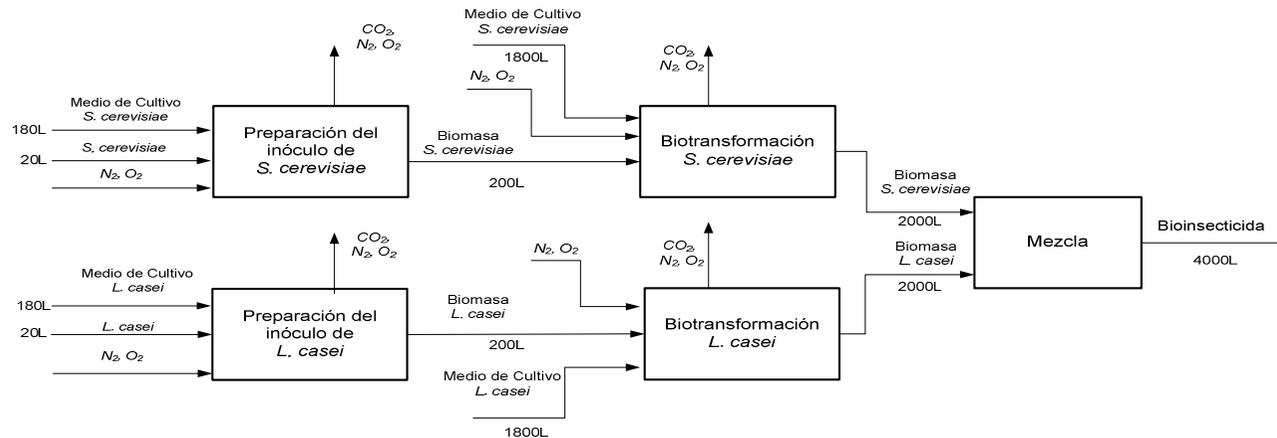
- Diagrama General de Entradas y Salidas

Figura 9. Diagrama general de entradas y salidas



- Diagrama Genérico de Bloques

Figura 10. Diagrama genérico de bloques



- Diagrama de Bloques de Proceso

Figura 11. Diagrama de Bloques de Proceso

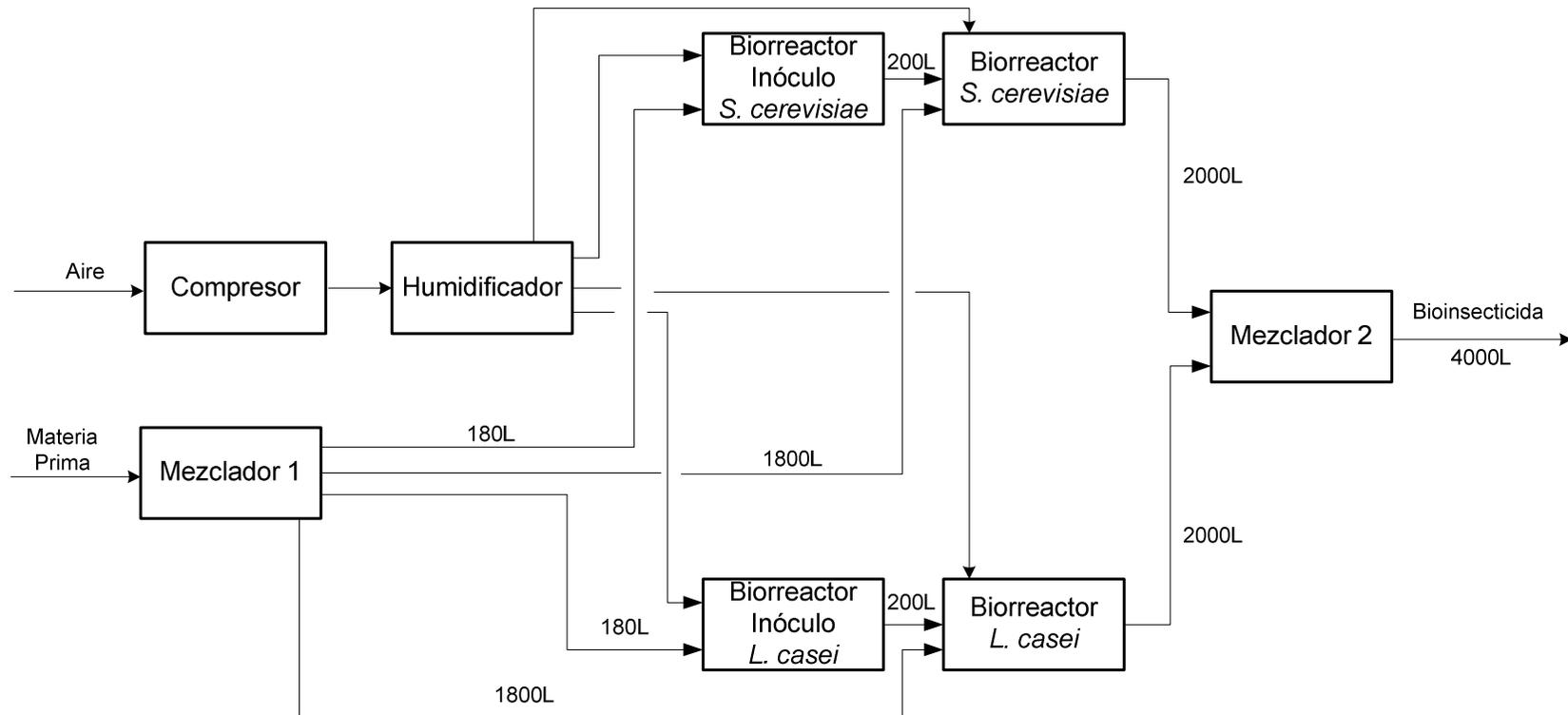
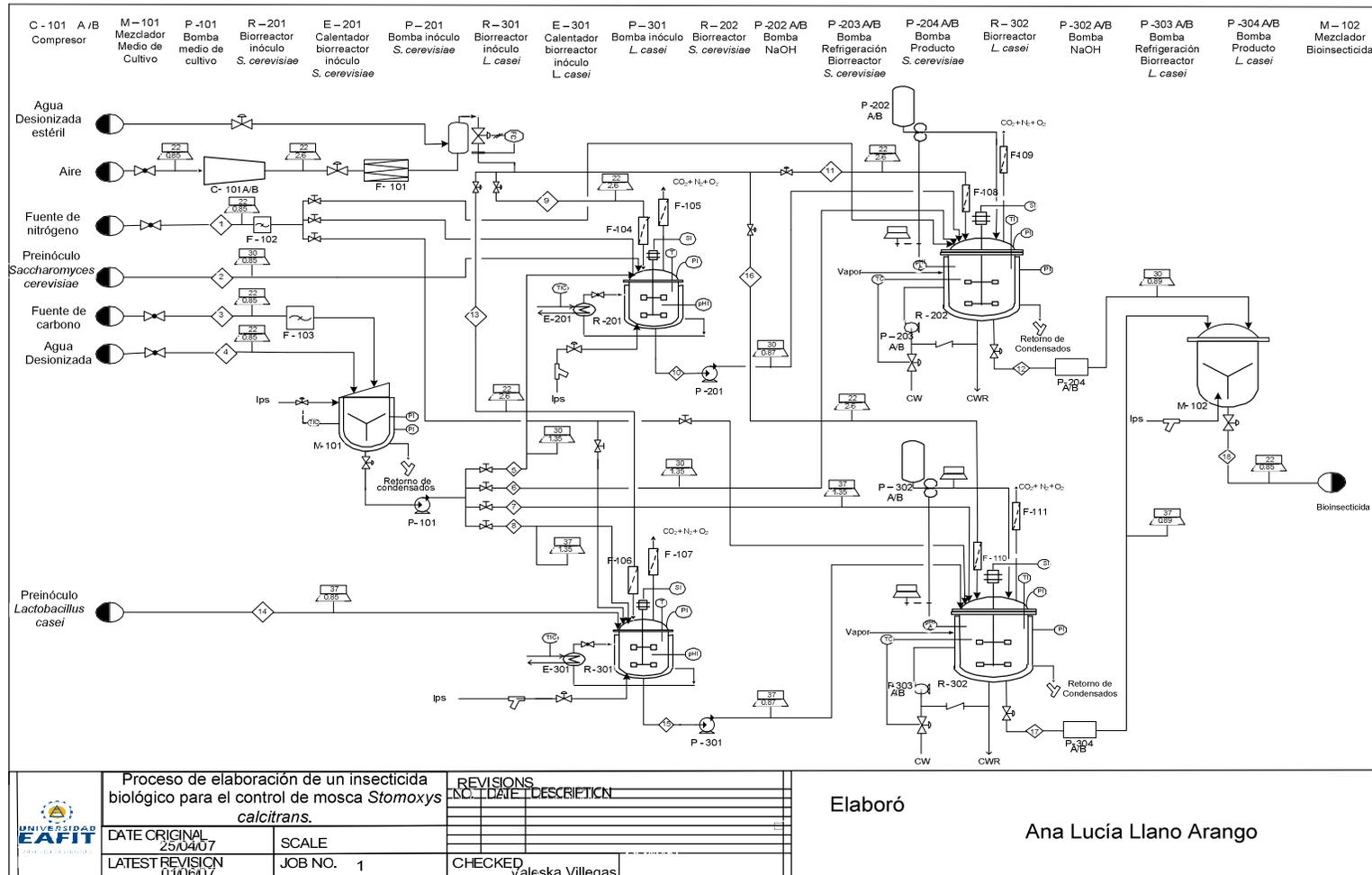


Diagrama de Flujo de Proceso (PFD)

Figura 12. Diagrama de flujo de proceso (Ver anexo H)



- **Descripción de los equipos**

Una vez definidas las operaciones que deben llevarse a cabo, se procede a realizar una selección de los equipos que se ajustan a los requerimientos del proceso.

C – 101. Compresor Rotatorio. Estos sistemas son compresores de desplazamiento positivo en los que se manejan bajos rangos de compresión y son ampliamente usados para comprimir aire (África *et al.*, 1999).

P – 101, P – 201, P – 301. Bombas Centrífugas. Entre las bombas más usadas se encuentran las bombas centrífugas, para mantener los requerimientos de higiene del proceso, deben estar equipadas con sellos mecánicos. Una ventaja es que en el mercado existen una gran variedad de bombas centrífugas que operan a diferentes rangos de flujo y presión (Ullmann's, 1996).

P – 203, P – 303. Bombas Centrífugas. Es seleccionada para el transporte del fluido refrigerante a través de la chaqueta de los reactores R – 201 y R – 301. Se seleccionó este tipo de bomba por ser muy eficientes, económicas y versátiles (Turton *et al.*, 2003).

P – 204, P – 304. Bombas Neumáticas. Son muy utilizadas en la industria para el movimiento de prácticamente cualquier líquido, ya que se construyen en gran cantidad de materiales. Poseen ciertas ventajas frente a otros tipos de bombas, ya que no poseen cierres mecánicos ni empaquetaduras que son las principales causas de rotura de dicho equipos (Walas, 1990).

P – 202, P – 302. Bombas peristálticas. Es un tipo de bomba de desplazamiento positivo usada para bombear una variedad de fluidos. Son típicamente usadas para bombear fluidos limpios o estériles (Ullmann's, 1996).

E – 201, E – 301. Intercambiadores de Doble Tubo. Se eligió este tipo de intercambiador ya que requiere un área de transferencia de calor muy pequeña, son económicos y de fácil diseño (Walas, 1990).

M – 101 . Mezclador, Impeler de cuchillas planas. Sirve para mezclar fluidos de alta viscosidad, es de geometría simple y fácil limpieza, se encuentra cubierto por material aislante para reducir las pérdidas por calor (Walas, 1990). Estas características lo hacen adecuado para el proceso en el cual se tiene una viscosidad relativamente alta y la mezcla tiende a adherirse a las cuchillas del mezclador.

M – 102. Mezclador de flujo o corriente. En este mezclador se introducen los materiales por medio de una bomba y la mezcla se produce por interferencia de sus flujos corrientes. Sólo se emplea para la mezcla completa de fluidos miscibles (Walas, 1990).

- **Tablas de información del proceso**

Tabla 28. Tabla preliminar de equipos para el proceso

Equipo	C -101	P - 101	P - 201	P - 202	P - 203
MOC	Acero al carbón	Acero al carbón	Acero al carbón	Acero inoxidable	Acero al carbón
Potencia (W)	462	370	115	100	106
Tipo	Reciprocante	Centrífuga	Centrífuga	Peristáltica	Centrífuga
Temperatura (°C)	22	30 - 37	30	22	22
Presión entrada (bar)	0.85	0.85	0.89	0.85	3.45
Presión salida (bar)	2.6	3.95	1.35	1.35	3.95

Tabla 18 (Continuación)

Equipo	P - 204	P - 301	P - 302	P - 303	P - 304
MOC	Acero inoxidable	Acero al carbón	Acero inoxidable	Acero al carbón	Acero inoxidable
Potencia (W)	370	115	100	106	370
Tipo	Neumática	Centrífuga	Peristáltica	Centrífuga	Neumática
Temperatura (°C)	30	37	22	22	37
Presión entrada (bar)	0.89	0.89	0.85	3.45	0.89
Presión salida (bar)	1.35	1.35	1.35	3.95	1.35

Tabla 18 (Continuación)

Equipo	R - 201	R - 202	R - 301	R - 302
MOC	Acero inoxidable	Acero inoxidable	Acero inoxidable	Acero inoxidable
	316 L	316 L	316 L	316 L
Diámetro interno (m)	0.2113	0.4552	0.2113	0.4552
Altura/longitud	4.37	9.57	4.37	9.57
Orientación	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical
Tipo de turbina	Rushton	Rushton	Rushton	Rushton
Número de impelentes	2	2	2	2
Número de bafles	4	4	4	4
Temperatura (°C)	30	30	37	37
Presión (bar)	0.8532	0.8532	0.8532	0.8532

Tabla 18 (Continuación)

Equipo	E - 201	E - 202
MOC	Acero al carbón	Acero al carbón
Tipo	Doble tubo	Doble tubo
Área (m ²)	1.1821*10 ⁻²	2.2078*10 ⁻²
Presión (bar)	6.95	6.95
Temperatura máxima (°C)	185	185
Fase	Líquida	Líquida

Las propiedades expuestas en las tablas de los equipos fueron calculadas con ecuaciones heurísticas reportadas por Turton *et al.*, estos métodos de cálculo cortos basados en años de experiencia en la industria química permiten la visualización general de nuevos procesos, como lo son los biotecnológicos, además, ayudan a entender problemas en determinados sistemas de operación y proporcionan una interesante aproximación inicial a los cálculos del proceso (Turton *et al.*, 2003).

Tabla 19. Tabla de resumen de cargas y corrientes para el proceso de elaboración del bioinsecticida

Corriente	1	2	3	4	5	6
Descripción	Fuente de nitrógeno	Preinóculo <i>S. cerevisiae</i>	Fuente de carbono	Agua desionizada	Medio de cultivo inóculo <i>S. cerevisiae</i>	Medio de cultivo biotransformación <i>S. cerevisiae</i>
Tipo de corriente	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua
Temperatura (°C)	22.00	30.00	22.00	22.00	30.00	30.00
Presión (bar)	0.85	0.85	0.85	0.85	1.35	1.35
Concentración (g / l)	0.50	1.50	50.00			
Flujo de operación (g / batch)	2,000.00		508,647.00	3,600,000.00		
Volúmen de operación (l / batch)		20.00	365.93	3,600.00	180.00	1,800.00
Flujo de diseño (vvm)						
Flujo de diseño (m ³ /s)						

Tabla 19. (Continuación)

Corriente	7	8	9	10	11	12
Descripción	Medio de cultivo biotransformación <i>L. casei</i>	Medio de cultivo inóculo <i>L. casei</i>	Aire inóculo <i>S. cerevisiae</i>	Inóculo <i>S. cerevisiae</i>	Aire biotransformación <i>S. cerevisiae</i>	Producto <i>S. cerevisiae</i>
Tipo de corriente	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua
Temperatura (°C)	37.00	37.00	22.00	30.00	22.00	30.00
Presión (bar)	1.35	1.35	2.60	0.87	2.60	0.89
Concentración (g / l)				1.50		4.74
Flujo de operación (g / batch)						
Volúmen de operación (l / batch)	1,800.00	180.00		200.00		2,000.00
Flujo de diseño (vvm)			0.3438		0.2016	
Flujo de diseño (m ³ /s)			1.15E-03		6.71E-03	

Tabla 19. (Continuación)

Corriente	13	14	15	16	17	18
Descripción	Aire inóculo <i>casei</i> L	Preinóculo <i>casei</i> L.	Inóculo <i>casei</i> L.	Aire biotransformación <i>L. casei</i>	Producto <i>casei</i> L.	Bioinsectida
Tipo de corriente	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua
Temperatura (°C)	22.00	37.00	37.00	22.00	37.00	22.00
Presión (bar)	2.60	0.85	0.87	2.60	0.89	0.85
Concentración (g / l)		0.50	0.50		6.41	11.15
Flujo de operación (g / batch)						
Volúmen de operación (l / batch)		20.00	200.00		2,000.00	4,000.00
Flujo de diseño (vvm)	0.2406		0.14	0.1411		
Flujo de diseño (m ³ /s)	8.02E-04		0.00	4.70E-03		

5. CONCLUSIONES

El factor aireación presenta una gran influencia sobre la producción de biomasa de *L. casei* ya que a velocidades de aireación menores existe una mayor producción de ácido láctico, el cual inhibe el crecimiento celular. La producción máxima de biomasa de *L. casei* se presenta a una velocidad de aireación de 0.7 vvm, obteniéndose una concentración de 6.410 g/L en 20 horas y un rendimiento de sustrato en biomasa de 0.2072 g/g.

La producción de biomasa de *S. cerevisiae* en un sistema batch está influenciada significativamente por la temperatura, obteniéndose una concentración de biomasa máxima de 4.74 g/L en 12 h y un rendimiento de sustrato en biomasa de 0.1077g/g a 30°C. Este factor es de suma importancia ya que la temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 35 °C.

Del estudio de mercado se puede inferir que el sector de los bioinsecticidas está en crecimiento y en general que todos los productos de origen biológico (bioinsumos) tienen un gran auge a nivel mundial. En la actualidad el mercado de bioinsecticidas en Colombia abarca el 1% del mercado de los insecticidas. Esto genera grandes posibilidades de desarrollo de nuevos productos para el sector agropecuario.

Existe un amplio mercado para el insecticida biológico entre los ganaderos de producción de leche y carne del país, lo que resultaría rentable para una nueva oportunidad de negocio.

Siendo la aireación un factor relevante en ambos procesos el criterio de escalamiento seleccionado ($K_L a$) es un buen parámetro para escalar este tipo

de fermentaciones. El K_La es una herramienta muy útil para garantizar que las condiciones de aireación permanezcan constantes al realizar el cambio de escala y no se afecte significativamente la productividad.

El diseño conceptual del proceso de producción del bioinsecticida logra entender los diferentes componentes del proceso y sus relaciones por medio de los diagramas de bloque y de flujo, herramientas fundamentales en la ingeniería.

El proceso de producción del bioinsecticida es técnicamente viable y posee una alta aceptación por parte de los ganaderos de la región lechera de Cundinamarca, debido al alto desempeño del bioinsecticida como controlador de la mosca de establo *Stomoxys calcitrans*.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar tratamientos a diferentes velocidades de agitación para *S. cerevisiae* y *L. casei* con el fin de evaluar el efecto de esta variable en el mezclado, en la transferencia de oxígeno del sistema y en la producción de biomasa.
- Formular un medio de cultivo igualmente económico al empleado, pero que contenga todos los nutrientes necesarios para aumentar la producción de biomasa de los microorganismos.
- Evaluar la producción de biomasa por medio de un proceso fed batch ya que este busca alargar la fase exponencial de producción de biomasa para aumentar la cantidad de la misma. El proceso de producción comienza como si fuera un cultivo tipo batch, cuando los sustratos de crecimiento (azúcares) han sido consumidos, se agregan de nuevo al cultivo permitiendo alargar la fase exponencial (Dorán, 1999).
- Comprobar el escalado conceptual realizado en un bioreactor de 20 L.
- Verificar la calidad del producto desarrollado en el laboratorio, realizando los ensayos de campo necesarios para obtener información que pueda compararse con el producto desarrollado inicialmente por Alquería S.A.
- Realizar los balances de materia y energía del proceso de manera detallada con el fin de obtener toda la información necesaria para llevar a cabo un estudio de factibilidad técnico – económico completo del proyecto.
- Efectuar un análisis de estabilidad del bioinsecticida por medio de un conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro de los microorganismos que

lo componen así como la evaluación de la vida útil del mismo en el tiempo. Esto con el fin de determinar su viabilidad para obtener un registro ICA y poder ingresar al mercado de los bioinsumos.

BIBLIOGRAFÍA

AFRICA, M., KENDRICK, R., SCRAMLIN, J., CATALANO, S., MESSACAR, J., PALAZZOLO, J. (1999). Visual encyclopedia of chemical engineering equipment. Estados Unidos. Macromedia.

ASENJO, J. (1995). Bacterial, Yeast, and Fungal Cultures, Scale-Up. En: Biorreactor System Design. U.S.A. Marcel Dekker, inc.

BARRANTES, X., RAILEY, D., ARIAS, M., CHAVES, C. (2004). Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. Revista Alann, Vol 54, Nro 3. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

BARRERA, M. (2004). Diseño y escalamiento de un reactor biológico para la producción de microorganismos probióticos en un medio de cultivo no lácteo. Trabajo de grado. Ingeniera Química. Universidad de los Andes, Bogotá. Colombia.

BECK, C., y MEYENBURG, H. K.. (1968). Enzyme pattern and aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various degrees of glucose limitation. EN: Journal of bacteriology. Vol. 96; N° 2; p. 476-486.

BELLO, G. (1994). Líneas Celulares de Crecimiento Continuo de *Anopheles albimanus* y *Aedes taeniorhynchus* (díptera: culicidae) y susceptibilidad a infecciones con Arbovirus Ent. Diógenes. Colciencias y Universidad de la Salle. Colombia.

BRUCE, W., DECKER, G. (1958). The Relationship of Stable fly abundance to Milk Production in Dairy Cattle. J. Econ. Entomol.

BURGES, H.D. (1998). Formulation of Microbial Biopesticides. Kluwer Academic Publishers. Holanda.

BYFORD, R., CRAIG, M., CROSBY, B. (1992). A review of ectoparasites and their effect on cattle production. J Anim Sci.

CAMPBELL, J., CATANGUI, M., THOMAS, G., BOXLER, D., DAVIS, R. (1993). Effects of stable flies (Diptera: muscidae) and heat stress on weight gain and feed conversion of feeder cattle. Agric Entomol.

CAMPBELL, J. (2006). Stable fly control on cattle. In: Neb Guide. Publisher by University of Nebraska – Lincoln, Extensión. Institute of Agricultura and Natural Resources.

CAMPBELL, J., DUANE, R. (2006). Sanitation for fly and disease management at confined livestock facilities. In: Neb Guide. Publisher by University of Nebraska – Lincoln, Extensión. Institute of Agricultura and Natural Resources.

CEPEDA - SILLER, M. (2001). Evaluación de la efectividad biológica de Biostat *Paecilomyces lilacinus* (Thom) samsom, para el control de nemátodos en papa (*Solanum tuberosum*. L.) en Navidad, Galeana, León, México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. México.

CRUZ-VÁZQUEZ, C., MARTÍNEZ, S., VITELA, I., RAMOS, M., QUINTERO, M., GARCÍA, Z. (1999). Presencia de *Haematobia irritans* (L.)(Diptera:Muscidae) en ganado lechero estabulado de Aguascalientes, México: Informe preliminar. Vet Mex:30(2):196.

CRUZ-VÁZQUEZ, C., MARTÍNEZ, S., VITELA, I., RAMOS, M., QUINTERO, M., GARCÍA, Z. (1999). Presencia de estiércol e infestación por mosca del establo, *Stomoxys Calcitrans* (L.). México.

CRUZ-VÁZQUEZ, C., MARTÍNEZ, S., VITELA, I., RAMOS, M., QUINTERO, M., GARCÍA, Z. (2000). Variación anual de la infestación por *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) en tres establos lecheros de Aguascalientes, México. Tec Pecu Mex; 38(2):135-140.

CNMA-CHILE. Comisión Nacional del Medio Ambiente-Región Metropolitana (1998). Guía para el control y prevención de la contaminación industrial: Fabricación de Levaduras. Santiago. 57 p.

DORAN, P. (1999). Fluid flow and Mixing. En: Bioprocess engineering Principles. London. Academia Press Limited. p. 139.

DRUMMOND, R. (1977). Resistance in ticks and insecto of veterinary importante. In: Watson DL, Brown AW, editors. Pesticide Management and Insecticida resistance. Washington Academic.

DUARTE, A. (1998). Introducción a la ingeniería Bioquímica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

DURANGO, L.. (2007). Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo *Saccharomyces spp.* a nivel de laboratorio.

ESTRADA, M. (1997). Aplicación de *Bauveria bassiana* en la lucha biológica contra *Diarrea saccharalis*. En: Caña de Azúcar. Vol 15 (I): 39 – 43. La Habana. Cuba.

FELDMANN, H. (2005). Yeast Molecular Biology: A short compendium on basic features and novel aspects. Munich: University of Munich. Adolf Butenandt Institute.

FERNÁNDEZ, C. (2002). Biopesticidas: ¿La agricultura del Futuro?. Barcelona.

FOIL, L., HOGSETTE, J. (1994). Biology and control of tabanids. Stable flies and Horn flies. Rev Sci Tech off Int. Epiz.

FRICK, O., Y WITTMANN, C.. (2005). characterization of metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. Microbial cell factories.

GOJMERAC, W. (2001). Identifying and controlling flies. University of Wisconsin. U.S.A.

GÓMEZ, C.J. (2004). Obtención de microorganismos prebióticos en un medio no láctico. Trabajo de grado. Ingeniería Química. Universidad de los Andes, Bogotá. Colombia.

GUILLIERMOND, A. (1920). The yeast. New Cork: John Wiley and Sons Inc.

HINCAPIÉ, A., MARTÍNEZ, L., TOBÓN, Y. (2005). Diseño de un proceso para obtención de micelio y metabolitos de *Ganoderma lucidum* en un sistema de fermentación discontinuo. Trabajo de grado. Ingeniería de Procesos. Universidad Eafit, Medellín. Colombia.

HENSIRISAK, Patcharee. (1997). Scale-up the use of a microbubble dispersion to increase oxygen transfer in aerobic fermentation of baker's yeast. Tesis (Master de

Ciencias en Ingeniería de Sistemas Biológicos). Blacksburg, Virginia: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Chemical Engineering. 97 p.

HUBBARD, D., LEDGER, S., HOFFMAN, J. (1994). Scaling – Up Aerobic fermentation which produce Non-Newtonian, Viscoelastic Broths. *Advances in Bioprocess Engineering*. U.S.A: 95- 101.

JARAMILLO, V., Y MILLÁN, A. P.. (2005). Estudio de diferentes parámetros para la optimización del crecimiento de *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*, como organismos probióticos, en un medio no láctico. Proyecto de grado (Ingeniero Químico). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. 193 p.

JIMÉNEZ, I., ROJAS, C. (2003). Escalamiento para la producción de un biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* en fermentadores de 14 y 250L con base en la transferencia de oxígeno. Trabajo de grado. Ingeniería Química. Universidad de los Andes, Bogotá. Colombia.

KAPONGO, J., GILIOMEE, J. (2000). The use of Effective Micro-organisms in the biological control of house flies associated with poultry production. *Afr. Entom.*

KUNZ, S. (1991). Epidemiology of the more important flies of cattle in México, Proc 2nd International seminary animal parasitology. Oaxtepec, Morelos. México.

LIVENSE, J., LIM, H. (1982). The growth and dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in Annual reports on fermentation processes (G. T. Tsao).

LYDERSEN, B., D'ELIA, N., NELSON, K. (1994). *Bioprocess Engineering: Systems. Equipment and Facilities*. U.S.A. Editorial John Wiley & Sons.

LYSYK, J. (1993). Adult resting and larval development sites of stable flies and house flies (Diptera: Muscidae) on dairies in Alberta. J. Econ. Entomol. 86(6): 1746–1753.

MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J. (2000). Microbiología Industrial. En: Brock Biología de los microorganismos. 8ª ed. España. Prentice Hall.

MANDERSON, G.J. y DOELLE, H.W. (1972). The effect of oxygen an pH on the glucose metabolism of *Lactobacillus casei* var. rhamnosus ATCC 7469. Antoine van Leeuwenhoek 38, 223-240

MANOVACÍA, N. P. y MORENO, A. M. (2005). Selección de cepas de levadura con características probióticos y prebióticas para ser usadas como aditivo en nutrición animal. Trabajo de Grado (Ingeniero químico). Bogotá: Universidad de América. Facultad de ingeniería química.

MILLER, G.. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagents for determination of reduciiong sugar. Analisis Chemical. 31: 26.31.

MILLER, R. (1995). The stable fly as a pest of dairy cattle. In: Thomas GD, Skoda SR, editors. The stable fly: a pest of human and domestic animals. University of Nebraska. Lincoln, NE. Agric Res Div Misc Public.

PALLERONI, N. (1970). Principios Generales de Microbiología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington.

PARAKULSUKSATID, Pramuk. (2000). Utilization of a microbubble dispersion to increase oxygen transfer in pilot-scale baker's yeast fermentation unit. Tesis (Master of science in biological system engineering). Blacksburg, Virginia: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. 108p.

PARRA, M. E.. (2004). Diseño y escalamiento de un reactor biológico para la producción de microorganismos probióticos en un medio de cultivo no lácteo. Tesis de grado (ingeniera química). Bogotá: Universidad de los Andes. Facultad de ingeniería química.

PARRODI, L., MARTÍNEZ, I. (2000). Control de Moscas hematófagas y la importancia de la resistencia a los insecticidas en el ganado productor de leche. Memorias X reunión Internacional sobre producción de carne y leche en climas cálidos. Baja California, México.

PIRT, S. J. (1965). The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proc. R. Soc. London Ser. B 163:224-231.

PRESCOTT, H. (2002). Microbiology. 5ª ed. U.S.A. McGraw – Hill.

QUINTERO, R. (1990). Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones. 1ª ed. México D.F.: Editorial Alambra, S.A.

RUDOLF, A., Y FREDRIKSSON, J.. (2000). Probing control of glucose feeding in *Saccharomyces cerevisiae* cultivations. Department of chemical engineering II, Lund University.

RUSFTON, J.H, COSTICH, E.W y EVERETT, H.J. (1950). Power characteristics of mixing impellers. Parts I and II. Chem. Eng. Prog. 46, 395 - 404, 467-467. En: Fluid flow and Mixing. London. Academia Press Limited. p. 139.

SEPÚLVEDA, Paul. (2005). Evaluación de la velocidad de dilución en un proceso de fermentación continuo de *Escherichia coli* recombinante productora de α -amilasa. Proyecto de grado (Ingeniero Químico). Bogota: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. 111p.

SHULER, M.; KARGI, F. (1992). Bioprocess engineering: Basics concepts. New Jersey, USA. Editorial Prentice Hall.

SNEATH, P. (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol II. U.S.A. William & Wilkins.

STANBURY, P. (1995). Principles of Fermentation Technology. 2^a ed. Reino Unido. Butterworth – Heinemann.

TORRES, A., REYES, Y., DE LA TORRE, M. (2002). Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas, XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería, México.

TREYBAL, R. (1988). Operaciones de transferencia de Masa. 2^a ed. México. McGraw – Hill.

TURTON, R., BAILIE, R., WHITING, W., SHAEWITZ, J. (2003). Analysis, Synthesis and Design of Chemical Processes. Segunda edición. Estados Unidos. Editorial Prentice Hall. pp 57-58

ULLMANN'S. (1996). Enciclopedia of Industrial Chemistry. 5^a ed. Editorial Advisory Board.

VARGAS, E.M.; GÓMEZ, C. J.; PARRA, M. E. y ROMERO, M. A.. (2004). Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (primera parte). Revista Facultad de ingeniería universidad de los andes paginas 167-176.

VÁZQUEZ, L., CASTELLANOS, J. (1997). Desarrollo del control biológico de plagas en la agricultura cubana. AgroEnfoque 91: 14-15.

VERDUYN, C., *et al.*. (1991). A theoretical evaluation of growth yields of yeast. *Antonie Leeuwenhoek* 59:49-63.

WALAS, S. (1990). Mixing and Agitation. En: *Chemical Process Equipment: Selection and Design*. U.S.A. Butterworth – Heinemann.

WICKEN, A. J., AYRES, A., CAMPBELL, L. K., y KNOX, K. W. (1983). Effect of growth conditions on production of rhamnose-containing cell wall and capsular polysaccharides y strains of *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus. EN: *Journal of Bacteriology*, 153: 84 –92.

ZAPATA, P., PUERTA, J. (2006). Diseño conceptual de un proceso para la elaboración de un producto funcional a partir de *Ganoderma lucidum*. Trabajo de grado. Ingeniería de Procesos. Universidad Eafit, Medellín. Colombia.

CYBERGRAFIA.

AGRONET. (2006). Productos a base de Bioinsumos Comercializados en Colombia. [Disponible en Internet]. http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2007326113543_EMPresasBIOINSUMOS2006.pdf. [Consulta: marzo 30 de 2007].

ANÓNIMO 1. (2005). Asesoría Veterinaria. [Disponible en Internet]. <http://www.ceba.com.co/novartis2.htm>. [Consulta: Noviembre 24 de 2005].

ANÓNIMO 2. (2006). Monografía *Trichoderma spp.* [Disponible en Internet]. <http://www.reuna.unalmed.edu.co/modules.php?name=Sections&op=viewarticle&artid=198> [Consulta: Mayo 5 de 2007].

ANÓNIMO 3. (2006). Taxonomía de *S. cerevisiae*. [Disponible en Internet]. <http://www.hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/039.PDF>. [Consulta: Mayo 18 de 2006].

CASTILLO, J. (2004). Fermentación Ácido-Láctica. [Disponible en Internet]. <http://www.monografias.com/trabajos15/fermentacion-acidolactica/fermentacion-acidolactica.shtml>. [Consulta: Agosto 23 de 2006].

DRUGUERI, L. (2005) "Stomoxys Calcitrans". [Disponible en Internet]. <http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/establos.htm>. [Consulta: Noviembre 27 de 2005].

Emrousa. EM- Effective Microorganisms. [Disponible en Internet]. www.emrousa.com. [Consulta: marzo 29 de 2007]

FUNDASES. (2007). Historia, política de calidad, objetivos y alianzas. [Disponible en Internet]. http://www.fundases.com/p/quienes_somos.html. [Consulta: Mayo 18 de 2007].

ICA-Normatividad. [Disponible en Internet]. <http://www.ica.gov.co/Normatividad/normas/Archivos/2004r375.pdf>. [Consulta: Febrero 2006].

INGA, F. (2006). La contaminación del suelo, Ecología y Medio Ambiente. [Disponible en Internet]. <http://www.monografias.com/trabajos31/contaminacion-suelo/contaminacion-suelo.shtml>. [Consulta: Septiembre 1 de 2006].

KALISCH, J. (2006). UNL Entomology. [Disponible en Internet]. <http://entomology.unl.edu/images/muscidflies/index.htm>. [Consulta: Septiembre 12 de 2006].

POBALLE. (2007).Catalogo de productos. [Disponible en Internet].
www.poballe.com/fichas/ficha10.htm. [Consulta: mayo 28 de 2007].

PROEXPORT. (2005). Bioinsumos, una alternativa. [Disponible en Internet].
http://www.proexport.com.co/VBeContent/library/documents/DocNewsNo4287DocumentNo3744.HTM#_Toc99783238. [Consulta: marzo 26 de 2007].

RAMÍREZ, R. A. (2000). Premio amway de periodismo ambiental. [Disponible en Internet].
http://www.amwaycolombia.com.co/Premio_Periodismo/file/2000/Segundo_Puesto.pdf. [Disponible en Internet]. [Consulta: marzo 30 de 2007].

TEXTOS CIENTÍFICOS. (2007). Urea. [Disponible en Internet].
www.textoscientificos.com/quimica/urea). [Consulta: abril 28 de 2007].

ANEXO A. MÉTODO DEL ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)

Pasos para preparar DNS:

- Disolver 1.6 g de NaOH en H₂O destilada.
- Adicionar 30 g de tartrato de Na y K
- Adicionar 1 g de DNS
- Aforar a 100 ml con H₂O destilada
- Almacenar en frascos ámbar a 4 °C

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

A partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con la siguientes concentraciones (g/l): 0.25, 0.5, 1, 2 y 4.

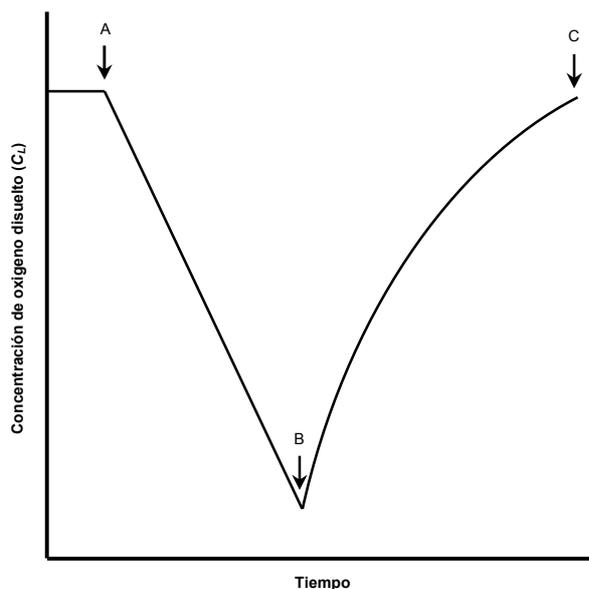
Procedimiento:

- Tomar 0.5 ml de cada dilución y agregar 0.5 ml de reactivo DNS.
- Preparar una muestra blanco por dilución de 0.5 ml de H₂O destilada a 0.5 ml del reactivo de DNS.
- Agitar todas las muestras.
- Colocar a ebulir las muestras en baño maría por 5 minutos.
- Enfriar con hielo.
- Adicionar 5 ml de H₂O destilada.
- Agitar y dejar en reposo 15 min.
- Leer a 540 nm.
- Realizar la curva Absorbancia versus concentración. Debe tener un coeficiente de correlación de 0.991 a 0.999.

ANEXO B METODOLOGÍA PARA LA MEDICIÓN DEL K_LA

El procedimiento consiste en suspender la aireación del reactor, lo cual resulta en un decaimiento lineal de la concentración de oxígeno disuelto debido a la respiración del cultivo. Luego se reanuda la aireación y la concentración de oxígeno disuelto aumenta para alcanzar el valor inicial, como se ilustra en la siguiente figura (Sepúlveda, 2005).

Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo para el método dinámico de eliminación de gas para la determinación de K_La . La aireación se suspende en el punto A y se reanuda en el punto B.



En el punto B el aire suministrado al cultivo aumenta la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo y C es el punto donde es posible que la concentración de oxígeno disuelto alcance rápidamente el equilibrio, por esto es necesario asumir que la aireación es lo suficientemente rápida para que no genere un efecto en el crecimiento celular. La pendiente de la línea AB es una medida de

la tasa de respiración del cultivo; y el aumento de la concentración de oxígeno disuelto en el periodo BC es la diferencia entre la transferencia de oxígeno a la solución y la toma del oxígeno disuelto por las células, que se puede describir mediante la ecuación: (Parakulsuksatid, 2000; Sepúlveda, 2005).

$$\frac{dC}{dt} = K_L a(C^* - C) - xQ_{O_2}$$

Donde:

x [células/ ml] es la concentración de biomasa

Q_{O_2} [mmolO₂/gcélulas.h] es la demanda específica de oxígeno (tasa específica de respiración).

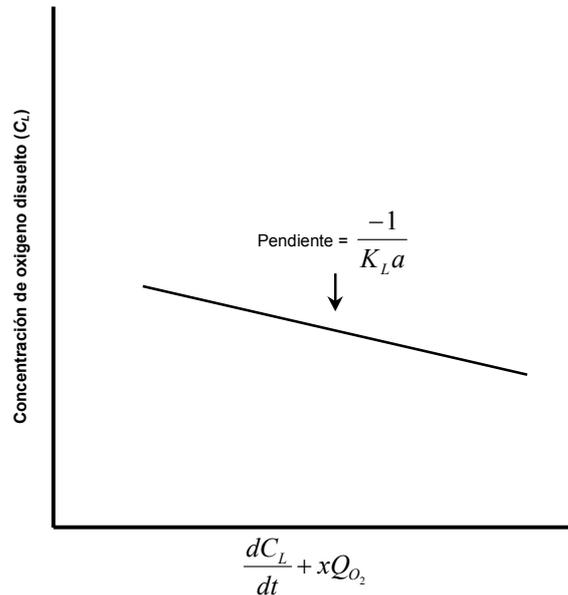
El término xQ_{O_2} es equivalente a la pendiente de la línea AB de la figura #.

Despejando el término C (concentración de aire disuelto en el seno del fluido) de la ecuación se obtiene (Sepúlveda, 2005):

$$C = -\frac{1}{K_L a} \left(\frac{dC}{dt} + xQ_{O_2} \right) + C^*$$

De la ecuación anterior, es posible graficar C Vs. $(\frac{dC}{dt} + xQ_{O_2})$ que generara una línea recta con pendiente $-1/k_{La}$ y pendiente C^* .

Método dinámico para la eliminación de gas para la determinación de $k_L a$.



La ventaja de este método es la facilidad para determinar el valor de $k_L a$ midiendo la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo. Sin embargo también conlleva algunas desventajas, como cuando el suministro de aire se suspende, debido a que la concentración de oxígeno en el punto B se acerca a la concentración crítica de oxígeno disuelto (C_{crit}), lo que puede favorecer el metabolismo anaeróbico en lugar del metabolismo aeróbico, además, el método requiere una prueba de oxígeno con un tiempo de respuesta rápido por que de lo contrario el resultado puede ser menos preciso (Parakulsuksatid, 2000).

Procedimiento:

- Suspender la aireación al reactor y tomar los valores de tensión de oxígeno disuelto (TOD) cada 10 segundos hasta que éste llegue al punto crítico.
- Reanudar la aireación al reactor y tomar los valores de tensión de oxígeno disuelto (TOD) cada 10 segundos hasta que este alcance el valor inicial.

- Graficar TOD Vs. tiempo para los valores tomados en el primer paso (gráfica 1).
- Determinar la pendiente de la gráfica anterior que es equivalente a la tasa de respiración del cultivo (xQ_{O_2})
- Graficar TOD Vs. $dTOD/dt + xQ_{O_2}$ para los valores tomados en el segundo paso.
- Determinar la pendiente de la gráfica que es equivalente a $-1/k_L a$

ANEXO C
ENCUESTA GANADEROS PROVEEDORES DE ALQUERÍA S.A

Para identificar el mercado potencial del insecticida biológico se realizó la siguiente encuesta a los ganaderos y/o trabajadores de algunas fincas proveedoras de leche de Alquería S.A.

	
ENCUESTA	
Fecha: _____	Municipio: _____
Nombre Finca: _____	
Propietario: _____	
Numero de animales: _____	
Extensión de la Finca: _____	
Confinamiento: Potreros _____	Establos _____
Tipo de Ordeño: Manual _____	Mecánico _____
1. Posee problemas de moscas? SI ___ NO ___	
2. En qué lugares? Potreros ___ Establo ___ Sala de Ordeño ___	Otro ___ Cuál? _____
3. La población es: Abundante ___ Moderada ___ Nula ___	
4. Considera usted que la presencia de mosca influye en la productividad del hato? SI ___ NO ___ Por qué? _____	
5. Controla la mosca con algún producto? SI ___ NO ___ Cuál? _____	
6. Cuánto le cuesta al mes? 50.000-100.000 ___ 100.000-500.000 ___ 500.000-1millón ___ más de 1 millón ___	
7. Estaría dispuesto a emplear un producto que controle las moscas no sólo en los animales sino también en superficies de establos, salas de ordeño, etc? SI ___ NO ___	

ANEXO D
RESULTADOS FERMENTACIONES *S. cerevisiae*

Los resultados para cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato de *S. cerevisiae* se cuantificaron en g/L. Dichos datos en promedio se muestran a continuación en las siguientes Tablas, con sus respectivos valores de error estándar (E).

Crecimiento celular de *S. cerevisiae* a diferentes temperaturas.

Tiempo (Horas)	Concentración Celular a 25° C		Concentración Celular a 30° C		Concentración Celular a 35° C	
	(g/L)	E	(g/L)	E	(g/L)	E
0	1.452	0.003	1.551	0.041	1.370	0.044
2	1.646	0.034	1.976	0.051	1.745	0.092
4	1.806	0.153	3.056	0.061	2.470	0.061
6	2.606	0.068	3.767	0.037	3.267	0.020
8	2.869	0.031	4.030	0.014	3.522	0.003
10	3.553	0.170	4.319	0.140	3.927	0.068
12	3.890	0.160	4.741	0.078	4.156	0.024

Consumo de sustrato de *S. cerevisiae* a diferentes temperaturas.

Tiempo (Horas)	DNS a 25° C		DNS a 30° C		DNS a 35° C	
	(g/L)	E	(g/L)	E	(g/L)	E
0	37.652	1.168	41.792	0.991	36.945	0.177
2	35.069	0.778	37.369	0.955	32.840	0.460
4	29.408	0.920	28.418	1.061	27.427	0.495
6	22.438	0.389	22.721	0.106	22.262	0.849
8	22.085	1.309	22.014	0.743	15.044	0.637
10	15.504	0.885	18.051	1.097	11.683	0.177
12	13.275	0.425	9.914	0.601	7.402	0.142

ANEXO E
RESULTADOS FERMENTACIONES *L. casei*

Para *Lactobacillus casei* los resultados de cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato se cuantificaron en g/L. En las siguientes tablas se muestran los datos en promedio con sus respectivos valores de error estándar (E).

Crecimiento celular de *L. casei* a diferentes velocidades de aireación.

Tiempo (Horas)	Concentración Celular 0.5 vvm		Concentración Celular 0.7 vvm		Concentración Celular 0.9 vvm	
	(g/L)	E	(g/L)	E	(g/L)	E
0	0.446	0.0160	0.563	0.0267	0.643	0.0213
2	0.574	0.0160	1.417	0.0480	0.734	0.0267
4	0.819	0.0693	2.270	0.0693	1.118	0.0480
6	1.091	0.0107	2.692	0.0107	1.625	0.0854
8	1.395	0.0267	3.412	0.0693	2.067	0.0267
10	1.939	0.0373	3.972	0.0213	2.606	0.0320
12	2.222	0.0427	4.351	0.0480	2.974	0.0587
14	2.910	0.0800	4.969	0.0800	3.390	0.0587
16	3.193	0.0427	6.122	0.0480	3.860	0.0800
18	3.876	0.0854	6.367	0.0053	4.415	0.0480
20	4.191	0.0480	6.410	0.0267	4.505	0.0107
22	4.841	0.0587	6.314	0.0160	4.532	0.0267
24	4.857	0.0533	6.404	0.0427	4.495	0.0747
26	5.055	0.0800			4.671	0.1227
28	4.905	0.0267				
30	5.113	0.1174				

Consumo de sustrato de *L. casei* a diferentes velocidades de aireación.

Tiempo (Horas)	DNS a 0.5 vvm		DNS a 0.7 vvm		DNS a 0.9 vvm	
	(g/L)	E	(g/L)	E	(g/L)	E
0	42.5631	0.4132	41.0942	0.2563	41.573	0.074
2	38.2437	0.2254	36.2604	0.6225	40.100	0.147
4	35.3516	0.1878	32.8915	0.2563	35.018	0.442
6	28.2903	0.2629	30.4746	0.4761	32.440	0.442
8	27.0132	0.2629	28.4605	0.5859	29.309	0.405
10	26.0742	0.2254	24.3958	0.8422	25.994	0.331
12	23.4075	0.3380	18.6832	0.4028	23.748	0.074
14	22.2431	0.4507	17.8409	0.0732	19.586	0.773
16	20.7031	0.1878	14.2156	0.2563	18.002	0.221
18	19.1256	0.4883	13.5931	0.0732	14.430	0.110
20	17.1725	0.2629	13.5198	0.2930	11.852	0.552
22	15.2945	0.2629	14.2889	0.2563	11.962	0.147
24	15.4447	0.1878	13.2635	0.1099	12.441	0.331
26	15.5574	0.0751			12.183	0.147
28	15.6325	0.2254				
30	15.6325	0.0751				

ANEXO F
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA *S. cerevisiae*

El análisis estadístico para *S. cerevisiae* fue realizado empleando el programa STATGRAPHICS Plus 5.1. Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

ANOVA Table for Biomasa by Temperatura

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.24284	2	0.621422	15.63	0.0259
Within groups	0.119245	3	0.0397483		
Total (Corr.)	1.36209	5			

Multiple Range Tests for Biomasa by Temperatura

Method: 95.0 percent Student-Newman-Keuls			
Temperatura	Count	Mean	Homogeneous Groups
35	2	3.88	X
25	2	4.0295	X
30	2	4.9115	X
Contrast		Difference	
25 - 30		*-0.882	
25 - 35		0.1495	
30 - 35		*1.0315	

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for Rendimiento by Temperatura

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.000231703	2	0.000115852	0.70	0.5639
Within groups	0.00049825	3	0.000166083		
Total (Corr.)	0.000729953	5			

Multiple Range Tests for Rendimiento by Temperatura

Method: 95.0 percent Student-Newman-Keuls			
Temperatura	Count	Mean	Homogeneous Groups
35	2	0.08755	X
25	2	0.08925	X
30	2	0.1015	X

Contrast	Difference
25 - 30	-0.01225
25 - 35	0.0017
30 - 35	0.01395

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for m Máxima by Temperatura

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0000160633	2	0.00000803167	0.17	0.8509
Within groups	0.00014129	3	0.0000470967		
Total (Corr.)	0.000157353	5			

Multiple Range Tests for m Máxima by Temperatura

Method: 95.0 percent Student-Newman-Keuls			
Temperatura	Count	Mean	Homogeneous Groups
25	2	0.09395	X
35	2	0.0951	X
30	2	0.09785	X

Contrast	Difference
25 - 30	-0.0039
25 - 35	-0.00115
30 - 35	0.00275

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO G
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA *L. casei*

Para *L. casei* el análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa STATGRAPHICS Plus 5.1, se tuvo en cuenta los resultados obtenidos en el laboratorio, sus duplicados y las réplicas para cada fermentación, los resultados se observan a continuación:

ANOVA Table for Biomasa by Uvm

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.99051	2	1.49526	23.87	0.0144
Within groups	0.187926	3	0.0626418		
Total (Corr.)	3.17844	5			

Multiple Range Tests for Biomasa by Uvm

Method: 95.0 percent Student-Newman-Keuls			
Uvm	Count	Mean	Homogeneous Groups
0.9	2	4.5745	X
0.5	2	5.6045	X
0.7	2	6.2925	X
Contrast		Difference	
0.5 - 0.7		-0.688	
0.5 - 0.9		*1.03	
0.7 - 0.9		*1.718	

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for Rendimiento by Uvm

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.00915004	2	0.00457502	1.99	0.2815
Within groups	0.0068892	3	0.0022964		
Total (Corr.)	0.0160392	5			

Multiple Range Tests for Rendimiento by Uvm

Method: 95.0 percent Student-Newman-Keuls

Uvm	Count	Mean	Homogeneous Groups
0.9	2	0.13685	X
0.7	2	0.1994	X
0.5	2	0.2308	X

Contrast	Difference
0.5 - 0.7	0.0314
0.5 - 0.9	0.09395
0.7 - 0.9	0.06255

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for m Máximo by Uvm

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.00148696	2	0.000743482	1.37	0.3771
Within groups	0.00162357	3	0.00054119		
Total (Corr.)	0.00311053	5			

Multiple Range Tests for m Máximo by Uvm

Method: 95.0 percent Student-Newman-Keuls			
Uvm	Count	Mean	Homogeneous Groups
0.5	2	0.06585	X
0.7	2	0.082	X
0.9	2	0.10425	X
Contrast			Difference
0.5 - 0.7			-0.01615
0.5 - 0.9			-0.0384
0.7 - 0.9			-0.02225

* denotes a statistically significant difference.