



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAISO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

ICB 695 Proyecto de Título

ESTUDIO DE LA PRE FACTIBILIDAD TÉCNICO-ECONÓMICA DE INSTALAR UNA
PLANTA PRODUCTORA DE MICROORGANISMOS PARA SU USO EN AGRICULTURA EN
CHILE

Alumnos: Constanza Melanie Haberland Fuchs
Javiera Riquelme Warnke

Profesores Guía: María Cristina Schiappacasse Dasati
Lorena Jorquera Martínez

agosto de 2015

RESUMEN

En el mercado de insumos de uso agrícola, el daño y mal uso de agroquímicos ha impulsado a su reemplazo por insumos biológicos, el cual en Chile ha ido aumentando paulatinamente. Es por esto que el presente trabajo tiene como objetivo general, evaluar la factibilidad técnico-económica de una planta productora de microorganismos para su uso en agricultura, con el fin de determinar si es posible la instalación de una planta de bioinoculantes en Chile.

En el marco de los bioinsumos, se analiza el mercado agrícola en el contexto nacional y de importación, para determinar la demanda de estos productos y de esta forma seleccionar el microorganismo a producir y la capacidad que deba tener la planta. A partir de este estudio se determina, que el mercado de biocontroladores es un mercado actualmente cubierto, a diferencia del mercado de bioinoculantes que sólo presentan importaciones y una muy baja producción nacional. A modo de estudiar un producto innovador, se selecciona la producción de microorganismos fijadores de nitrógeno y promotores del crecimiento vegetal, del género *Azospirillum* y *Azotobacter*, encapsulados en una matriz de alginato y almidón. De acuerdo a al estudio, se establece una cobertura del 20% de las posibles hectáreas cultivables, lo que se traduce en una producción de 81 kg de biomasa viable al año y 5.364 kg de producto encapsulado al año 2024.

El proceso de producción se presenta principalmente en 3 etapas: (1) La propagación del microorganismo, realizadas en cultivo por lote en reactores de tanque agitado; (2) la etapa de producción que consta de una fermentación piloto en un bioreactor; (3) el proceso de formulación que consta de la concentración, encapsulación y el secado del producto. A lo largo del proceso se estima un rendimiento del 34,7% donde el punto crítico es el secado.

A pesar del bajo rendimiento, el proyecto es rentable a partir de un precio de venta de 2,2 [USD/ha] (194 [USD/kg]) lo que representa un 5% del precio de venta del producto similar importado y un 2% del costo de fertilizar una hectárea con el equivalente químico. Cabe destacar que esto lo hace un proyecto sumamente atractivo, sin embargo se debe realizar un estudio de mercado con mayor profundidad para una estimación más fina de la capacidad de la planta.

La implementación de este proyecto considera una inversión inicial de 28.324 UF que corresponde a costos fijos como terreno, equipos, cañerías, etc, además de los costos de capital de trabajo correspondiente a los costos relacionados con la puesta en marcha. El costo total de producción se divide en un costo fijo de 9.797 UF y un costo variable que para el año 2024 alcanza los 544 UF. Se propone un precio de venta de 15 USD/ha, considerando que ya a un precio de 2,2 [USD/ha] el proyecto se hace rentable, de esta manera, la planta produce un bioinoculante cuya venta bordea los 1.320 USD/kg de producto.

De acuerdo al análisis de sensibilidad, se determina que el proyecto es rentable bajo los escenarios de aumento en el precio de venta y costo de materias primas. Sin embargo sensibilizando la viabilidad celular, se obtiene que el mínimo rendimiento de viabilidad celular en el secador para que el proyecto se haga rentable, es de un 5,8%, siendo así el período de recuperación de capital de 10 años. No obstante, cuando el rendimiento aumenta a un 10%, el proyecto se hace rentable con un TIR del 63% el último año y un período de recuperación de 3 años para una TRMA del 25%.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestras profesoras y guías María Cristina Schiappacasse y Lorena Jorquera, por apoyarnos y orientarnos en la elaboración de nuestro trabajo, siempre con buena disposición y entusiasmo.

Agradecemos a nuestras familias y amigos que nos acompañaron y apoyaron a lo largo de todo este proceso.

Agradecemos a los profesores Raúl Conejeros, Álvaro Díaz y a nuestros compañeros Alonso Godoy y Constanza Campaña que con muy buena voluntad nos ayudaron a resolver diversas inquietudes.

Agradecemos a Mauricio Schoebitz, a Dennis Poncelet y a Leonardo Raffo, que nos aportaron de manera significativa con sus experiencias en el rubro agrícola y a Jorge Rodríguez, quien nos ayudó con sus conocimientos de ingeniería.

Por último, agradecer a la Escuela de Ingeniería Bioquímica por contribuir en nuestra formación como profesionales.

Javiera y Melanie

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 GENERALIDADES	1
1.2 OBJETIVOS	6
CAPÍTULO 2	
ESTUDIO DE MERCADO, CAPACIDAD Y UBICACIÓN DE LA PLANTA.....	7
2.1 MERCADO DE BIOCONTROLADORES.....	10
2.1.1 Oferta de biocontroladores en base a microorganismos.....	13
2.2 MERCADO DE BIOINOCULANTES.....	20
2.2.1 Oferta de bioinoculantes en Chile.....	23
2.2.2 Caracterización y cuantificación de la demanda de bioinoculantes en Chile.....	28
2.3 SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....	32
2.3.1 Acerca de los microorganismos seleccionados	33
2.3.2 Co-inoculación de bacterias	34
2.3.3 Experiencias en el extranjero	35
2.3.4 Uso en Chile.....	36
2.4 ANÁLISIS DE LA PROYECCIÓN EN EL CONSUMO DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS.....	37
2.5 ANÁLISIS DE LA DEMANDA DE ACUERDO AL RUBRO DE APLICACIÓN AGROPECUARIA.....	38
2.6 CAPACIDAD DE LA PLANTA	43
2.7 UBICACIÓN DE LA PLANTA	44
CAPÍTULO 3 SÍNTESIS Y SELECCIÓN DE PROCESOS	47
3.1 MEDIO DE CULTIVO	47
3.1.1 Requerimientos nutricionales	47
3.1.2 Factores fisicoquímicos	52
3.1.3 Medio de cultivo para <i>Azospirillum spp.</i> y <i>Azotobacter spp.</i>	54

3.2	PRETRATAMIENTO	57
3.3	FERMENTACIÓN.....	59
3.4	FORMULACIÓN.....	62
3.4.1	Tipos de soporte utilizados en la formulación de bioinoculantes.....	63
3.4.2	Formas de aumentar la resistencia mecánica y mejorar la calidad de la cápsula	69
3.4.3	Sobre el tamaño de la cápsula	71
3.4.4	Concentración de la Biomasa.....	72
3.4.5	Preparación de la mezcla a encapsular y otras consideraciones	75
3.4.6	Encapsulación.....	78
3.4.7	Secado de las cápsulas.....	86
3.4.8	Diagrama del Proceso	92
CAPÍTULO 4 BALANCE DE MASA Y ENERGÍA		93
4.1	BALANCE DE MASA ETAPA DE FERMENTACIÓN.....	96
4.1.1	Cultivo de <i>Azotobacter vinelandii</i>	96
4.1.2	Demanda de oxígeno	102
4.1.3	Cultivo de <i>Azospirillum brasilense</i>	105
4.2	BALANCE DE ENERGÍA.....	105
4.2.1	Esterilización	108
4.3	CONCENTRACIÓN DEL CULTIVO CELULAR MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN....	110
4.4	MEZCLADO	114
4.5	ENCAPSULACIÓN.....	116
4.6	SEPARACIÓN MEDIANTE FILTRACIÓN.....	124
4.7	LAVADO DE LAS CÁPSULAS	125
4.8	SECADO	127
4.9	VIABILIDAD CELULAR	131
4.10	TRATAMIENTO DE RESIDUOS	132
CAPÍTULO 5 DISEÑO, ESTIMACIÓN Y SELECCIÓN DE EQUIPOS.....		135
5.1	ESTANQUE DE MEZCLA	135

5.1.1	Diseño de equipos M1 y M1'	135
5.1.2	Potencia de agitación	135
5.2	FERMENTACIÓN.....	136
5.2.1	Diseño de fermentadores	136
5.2.2	Potencia de agitación	139
5.3	SEPARADOR CENTRÍFUGO (S-1).....	141
5.4	ESTANQUE DE MEZCLADO (M-1).....	145
5.5	EQUIPO ENCAPSULADOR (J-1).....	148
5.6	ESTANQUE DE GELIFICACIÓN (E-1).....	149
5.7	EQUIPO DE FILTRADO (S-2).....	150
5.8	ESTANQUE DE RECEPCIÓN DE CaCl_2 (E-2)	151
5.9	SECADOR ROTATORIO DE CONTACTO DIRECTO (D-1)	153
5.9.1	Intercambiador de calor de tubo y carcaza	156
5.10	EQUIPOS AUXILIARES	157
5.10.1	Calderín.....	157
5.10.2	Compresor	158
5.10.3	Bombas	159
CAPÍTULO 6 ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA: DISTRIBUCION DE EQUIPOS Y PROGRAMACIÓN DE OPERACIONES Y PROCESOS		160
6.1.1	Planificación y organización de las etapas de producción	161
6.2	ORGANIZACIÓN ADMINISTRATIVA	163
6.2.1	Cargos necesarios por departamento.....	164
6.3	DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA PLANTA.....	165
CAPÍTULO 7 EVALUACIÓN ECONÓMICA		167
7.1	COSTO TOTAL DE INVERSIÓN.....	167
7.1.1	Costo fijo de inversión (CF)	167
7.1.2	Costo de capital de trabajo (CW).....	174
7.1.3	Resumen costo total de inversión.....	175

7.2	COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN (CTP).....	175
7.2.1	Costos de manufactura (CM).....	176
7.2.2	Costos fijos de producción (CFP).....	178
7.2.3	Costos generales de producción (CGP).....	180
7.2.4	Resumen costo total de producción.....	180
7.3	INGRESOS.....	181
7.4	FLUJO DE CAJA Y ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD.....	182
7.4.1	Modificaciones en el precio de venta del producto.....	184
7.4.2	Modificaciones en el precio de la materia prima.....	185
7.4.3	Modificaciones en el rendimiento de viabilidad celular.....	186
7.4.4	Rendimiento del producto sin etapa de formulación.....	187
	CAPÍTULO 8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	189
8.1	DISCUSIÓN.....	189
8.2	CONCLUSIONES.....	191
8.3	RECOMENDACIONES.....	192
	CAPÍTULO 9 NOMENCLATURA.....	194
	CAPÍTULO 10 REFERENCIAS.....	197
	CAPÍTULO 11 APÉNDICES.....	211

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Especies del género <i>Bacillus spp.</i> y sus actividades relacionadas	9
Tabla 2.2 Empresas nacionales productoras de biocontroladores	13
Tabla 2.3 Biocontroladores en base a microorganismos producidos en Chile.....	14
Tabla 2.4 Composición de productos biocontroladores con mayor CIF (US\$) de importación	17
Tabla 2.5 Biofertilizantes en base a microorganismos benéficos producidos en Chile	23
Tabla 2.6 Composición de productos inoculantes con mayor CIF (US\$) de importación.....	25
Tabla 2.7 Capacidad de uso/aptitud agrícola de las tierras	38
Tabla 2.8 Resumen superficie cultivada con posibilidad de inoculación	43
Tabla 2.9 Porcentaje de hectáreas cubiertas (o a cubrir) por TwinN	44
Tabla 2.10 Porcentaje de participación por región respecto a hectáreas cultivadas año 2012/2013.....	45
Tabla 3.1 Utilización de fuente de carbono disponible para distintas especies de <i>Azospirillum</i>	48
Tabla 3.2 Utilización de fuente de carbono disponible para distintas especies de <i>Azotobacter</i>	49
Tabla 3.3 Medio Dygs	55
Tabla 3.4 Medio Luria Bertani	55
Tabla 3.5 Medio Nfb.....	56
Tabla 3.6 Medio Burk.....	57
Tabla 3.7 Medio Burk modificado.....	58
Tabla 3.8 Condiciones de cultivo para escala laboratorio.....	61
Tabla 3.9 Tipos de soporte para inoculantes.....	63
Tabla 3.10 Características de la cápsula de acuerdo al tamaño seleccionado.....	72
Tabla 3.11 Concentración de los compuestos en la mezcla a extrusar y en la solución gelificante	78
Tabla 3.12 Productividades teóricas en dos diferentes frecuencias.	82

Tabla 4.1 Características de los fluidos involucrados	97
Tabla 4.2 Descripción de corrientes representadas en la Fig. 4.4	97
Tabla 4.3 Parámetros de crecimiento de <i>A. vinelandii</i> en medio Burk modificado en cultivo de 100ml.....	98
Tabla 4.4 Descripción de corrientes de propagación en matraz de 300 ml	99
Tabla 4.5 Parámetros de crecimiento de <i>A. vinelandii</i> en medio Burk modificado en cultivo de 2 L	100
Tabla 4.6 Parámetros de crecimiento de <i>A. vinelandii</i> en medio Burk modificado en cultivo de 10 L	100
Tabla 4.7 Descripción de corrientes de propagación en fermentadores de 3 L y 30 L.....	100
Tabla 4.8 Descripción de corrientes en fermentadores de 300 L.....	101
Tabla 4.9 Características corriente F ₇	102
Tabla 4.10 Velocidad de consumo de oxígeno en cultivo de bioreactor	103
Tabla 4.11 Requerimientos de oxígeno en R1, R2 y R3	104
Tabla 4.12 Resultados del balance de energía de la etapa de fermentación.....	106
Tabla 4.13 Resumen agua enfriamiento y dimensiones del serpentín.....	107
Tabla 4.14 Resumen consumo anual agua por enfriamiento	108
Tabla 4.15 Características vapor de caldera	108
Tabla 4.16 Características de fluidos en zona de calentamiento.....	109
Tabla 4.17 Características del fluido a enfriar	109
Tabla 4.18 Cantidades requeridas de vapor y agua para esterilización.....	110
Tabla 4.19 Resultados del balance de masa de la etapa de concentración mediante centrifugación para un lote.....	112
Tabla 4.20 Resultados del balance de energía de la etapa de concentración mediante centrifugación para un lote.....	113
Tabla 4.21 Resultados balance de masa de la etapa de mezclado para un lote	115
Tabla 4.22 Resultados balance de masa de la etapa de extrusión para un lote	121
Tabla 4.23 Resultados balance de masa de la etapa de separación por filtración para un lote	125

Tabla 4.24 Resultados balance de masa de la etapa de lavado para un lote	126
Tabla 4.25 Resultados balance de masa de la etapa de secado para un lote en [kg]	129
Tabla 4.26 Resultados balance de energía de la etapa de secado para un lote.....	131
Tabla 4.27 Composición cápsula final después del secado	132
Tabla 4.28 Residuos generados en un lote de producción.....	133
Tabla 4.29 Caracterización residuos generados en un lote.....	134
Tabla 5.1 Valores de diseño y selección de equipo mezclador M1 y M1'	135
Tabla 5.2 Datos para el cálculo de la potencia requerida en el agitador.....	136
Tabla 5.3 Resumen de potencias requeridas en el agitador.....	136
Tabla 5.4 Nomenclatura referente a la Fig. 5.1	137
Tabla 5.5 Razones recomendadas para el diseño de fermentador con impulsor tipo turbina Rushton de 6 paletas estándar	138
Tabla 5.6 Dimensiones de equipos R1, R2 y R3.....	138
Tabla 5.7 Dimensiones seleccionadas para equipos R1, R2 y R3	139
Tabla 5.8 Valores de número de Reynold	140
Tabla 5.9 Resumen potencia de agitación en reactores.....	141
Tabla 5.10 Datos para el cálculo de los parámetros de diseño de la centrífuga de discos ..	143
Tabla 5.11 Datos de la centrífuga seleccionada.....	144
Tabla 5.12 Dimensiones del estanque de mezclado	145
Tabla 5.13 Datos para el cálculo del número de Reynolds.....	146
Tabla 5.14 Datos para el cálculo de la potencia requerida en el agitador.....	147
Tabla 5.15 Datos de diseño y características del equipo encapsulador Jetcutter ®	149
Tabla 5.16 Datos de diseño y características del estanque de gelificación y túnel de pre-gelificación.....	150
Tabla 5.17 Datos de diseño y características del filtro	151
Tabla 5.18 Datos de diseño y características del estanque de recepción y acondicionamiento de CaCl ₂	152
Tabla 5.19 Resultados del cálculo de la potencia del agitador del estanque E-2	152

Tabla 5.20 Características del aire de secado y condiciones de operación en el secador...	154
Tabla 5.21 Datos de diseño y características del secador rotatorio de contacto directo.....	155
Tabla 5.22 Datos de diseño y características del intercambiador de calor	156
Tabla 5.23 Características del ventilador	157
Tabla 5.24 Requerimientos de vapor de caldera.....	157
Tabla 5.25 Características calderín seleccionado	158
Tabla 5.26 Requerimientos de aire comprimido	158
Tabla 5.27 Características compresor seleccionado	159
Tabla 5.28 Características de las bombas seleccionadas	159
Tabla 6.1 Estimación de la producción de biomasa a partir de la demanda proyectada.....	160
Tabla 6.2 Cargos por departamento	164
Tabla 6.3 Dimensión de equipos en planta piloto.....	165
Tabla 6.4 Dimensión de las instalaciones de la planta	165
Tabla 7.1 Indicadores económicos.....	167
Tabla 7.2 Porcentaje típico para el cálculo del costo adicional directo	169
Tabla 7.3 Costo de los equipos.....	171
Tabla 7.4 Costos fijos directos adicionales	173
Tabla 7.5 Costos fijos indirectos	173
Tabla 7.6 Resumen costo total fijo	174
Tabla 7.7 Resumen costo total de inversión.....	175
Tabla 7.8 Costo de materias primas	176
Tabla 7.9 Costo de suministros básicos.....	177
Tabla 7.10 Costo de manufactura anual	178
Tabla 7.11 Costo anual de mano de obra	178
Tabla 7.12 Costos fijos adicionales de producción.....	179
Tabla 7.13 Costos fijos de producción	180

Tabla 7.14 Costos generales de producción	180
Tabla 7.15 Costo total de producción.....	180
Tabla 7.16 Ingresos por venta	181
Tabla 7.17 Flujo de caja del proyecto.....	183

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 2.1 Participación de los principales productos comerciales respecto del total de controladores en base a microorganismos importados	18
Fig. 2.2 Variación de las importaciones de biocontroladores respecto a su valor CIF en el período 2005 -2013.....	19
Fig. 2.3 Participación de los principales productos comerciales respecto del total de bioinoculantes en base a microorganismos importados.....	27
Fig. 2.4 Evolución de las importaciones de bioinoculantes microbianos entre los años 2007 y 2013	29
Fig. 2.5 Superficie de cobertura por el total de bioinoculantes importados desde los años 2007 a 2013.....	31
Fig. 2.6 Evolución de las importaciones de bioinoculantes microbianos expresados en superficie de cobertura entre los años 2007 y 2013	32
Fig. 2.7 Proyección del consumo de bacterias con acción biofertilizante, específicamente utilizadas en la fijación de nitrógeno (TwinN).	37
Fig. 2.8 Serie histórica y proyección de la superficie total de cereales cultivada por temporadas	39
Fig. 2.9 Serie histórica y proyección de la superficie total de leguminosas y tubérculos cultivada por temporadas.....	40
Fig. 2.10 Serie histórica y proyección de la superficie total de frutales cultivada por temporadas	41
Fig. 2.11 Serie histórica y proyección de la superficie total de hortalizas cultivada por temporada	43
Fig. 2.12 Oferta y Demanda de recursos hídricos según región.....	46
Fig. 3.1 Diagrama representativo de una centrifuga tubular.....	73
Fig. 3.2 Diagrama representativo de una centrifuga de discos.....	74
Fig. 3.3 Estructura de la cápsula de alginato-almidón-Ca ⁺²	77
Fig. 3.4 Diferentes mecanismos de formación de la gota de acuerdo al aumento de flujo.....	79
Fig. 3.5 Diferentes técnicas de extrusión según la velocidad del flujo	80
Fig. 3.6 Equipo de encapsulación por vibración para escala laboratorio	81

Fig. 3.7 Diagrama del equipo JetCutter (geniaLab) y representación de la formación de las esferas debido al impacto con la rueda de corte	82
Fig. 3.8 Esquema de un proceso de encapsulación por atomización	84
Fig. 3.9 Esquema de dos de los tipos más comunes utilizados en encapsulación por lecho fluido.....	85
Fig. 3.10 Diagrama del Proceso.....	92
Fig. 4.1 Diagrama representativo del proceso de producción de bioinoculantes encapsulados	94
Fig. 4.2 Diagrama representativo de los flujos de servicio del proceso	95
Fig. 4.3 Diagrama del proceso de propagación.....	96
Fig. 4.4 Diagrama propagación en matraz	97
Fig. 4.5 Diagrama de propagación en fermentadores	99
Fig. 4.6 Diagrama de fermentación principal en reactor de 300 L	101
Fig. 4.7 Diagrama Separador Centrífugo (S-1).....	111
Fig. 4.8 Diagrama de equipo mezclador (M-3)	114
Fig. 4.9 Diagrama equipo encapsulador (J-1, E-1, S-2, E-2).....	117
Fig. 4.10 Perfil de acumulación de la solución de CaCl_2 y NaCl	123
Fig. 4.11 Diagrama Filtro (S-2).....	124
Fig. 4.12 Diagrama del equipo de lavado (S-2).....	126
Fig. 4.13 Diagrama del Equipo de Secado (D-1).....	127
Fig. 5.1 Nomenclatura en el fermentador	137
Fig. 5.2 Diagrama centrífuga de discos.....	143
Fig. 6.1 Diagrama de Gantt con distribución temporal de las tareas de producción	162
Fig. 6.2 Organización administrativa de la empresa.....	163
Fig. 7.1 Flujo de caja del proyecto	184
Fig. 7.2 Efecto del precio de venta del producto	185
Fig. 7.3 Efecto de la variación del costo de alginato.....	186
Fig. 7.4 Efecto de la variación del rendimiento de viabilidad celular en el secador.....	187

Fig. 7.5 Efecto en la variación del precio del producto sin formulación..... 188

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La agricultura es producto de un conjunto de acciones humanas que transforman el medio ambiente para dar origen a productos, alimentos u otras especies cuyo objetivo principal consiste en suministrarlas a la población creciente de su país u otros países, además de proveer un ingreso satisfactorio para el agricultor (FAO, 2002). Sus orígenes se remontan en la prehistoria y su desarrollo, el proceso de siembra y cultivo, se originó miles de años a.C. por culturas de la zona del Antiguo Egipto y Mesopotamia, donde los primeros cultivos fueron de maíz y cebada. Con el correr de los años se ha llegado a desarrollar una gran variedad de tecnologías que rigen el proceso de siembra y cultivo, donde ya no sólo basta con cultivar la tierra, sino que términos como productividad y rendimiento han ganado importancia

La agricultura moderna depende enormemente de la tecnología y la ciencia, donde la irrigación, la sanidad y la conservación son vitales para una agricultura exitosa. Otro ámbito importante de la agricultura, ya sea visto desde un punto de vista económico o productivo, es el rendimiento y la productividad de los cultivos, es por eso que se debe tener en cuenta, que para lograr buenos resultados, es indispensable la óptima sinergia del sistema suelo planta agua. Esto lleva al uso de buenas prácticas, mejorar el uso de fertilizantes y controladores, incentivos en la recuperación y reparación de suelos, entre otros.

Dentro de los aspectos ya nombrados, la tendencia mundial se ve fuertemente acentuada en el uso de fertilizantes, debido a su efecto positivo en el mejoramiento y enriquecimiento del suelo, aumentando la disponibilidad de nutrientes para la planta, por tanto, aumentando la calidad y rendimiento de los cultivos. Además, es importante destacar el lado negativo del uso de estos agroquímicos, donde uno de los puntos críticos es el gran impacto que tiene su producción en las emisiones totales de gases de efecto invernadero (GEI); a nivel mundial, la agricultura es responsable de un séptimo de las emisiones totales de GEI, derivado de la producción ganadera y de la fertilización nitrogenada (Barrera & Kremer, 2013). Otro efecto

negativo, es la cantidad de metales pesados o compuestos altamente tóxicos que muchos fertilizantes contienen, los cuales contaminan el suelo y a los agricultores u operarios que manipulan estos productos, además, muchos dañan la calidad de los suelos a largo plazo, ya que si bien, al momento de fertilizar el efecto es positivo para el cultivo, no lo es para el suelo donde estos se sitúan y permanecen ahí por años hasta incluso dejarlo infértil.

Esta problemática ha llevado a la sociedad a buscar alternativas de producción más amigables con el medio ambiente, encontrándose alternativas sostenibles y ecológicas como la agricultura orgánica, que presenta un desarrollo creciente, tanto en el ámbito nacional como mundial. Las diversas técnicas que esta agricultura involucran, promueven y estimulan el reciclaje, por ejemplo el uso de guano de animales y el uso de restos de la cosecha, el uso eficiente de los recursos como el agua y protección de los mismos, por ejemplo napas subterráneas, y otras aplicaciones de cómo lograr un equilibrio ecológico que permita disminuir el ataque de plagas y enfermedades (SAG, 2013).

La agricultura orgánica no sólo ha sido una opción viable a la sustitución parcial de los fertilizantes químicos, sino también una apuesta efectiva para quienes prefieren productos ecológicos; en general los productos agrícolas cultivados orgánicamente presentan mejor post cosecha y calidad nutricional y organoléptica que los cultivados tradicionalmente con fertilizantes químicos. La demanda de este tipo de alimentos ha aumentado enormemente y sobre todo en Europa, quienes son los mayores consumidores de productos orgánicos. Si bien los consumidores europeos prefieren comprar lo más localmente posible, existen épocas del año y frutas específicas que no son cultivables en sus tierras, por lo que esa falta de suministro es un mercado potencial tanto para Chile como para otros productores orgánicos.

Otro efecto de la fertilización y control mediante químicos ha sido el origen de una serie de regulaciones y exigencias respecto de su uso, comercialización y distribución. Por su inminente peligro para la sociedad y ecosistema esto también se vuelve un tema de índole social, por lo que se han generado normas y leyes que incluso restringen o restringirán su uso en varios países. En el año 2005 en la Unión Europea (UE), fue publicado el reglamento relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, esto debido a los altos índices de restos de plaguicidas en alimentos tales

como frutales y hortalizas. Chile, no se ve exento a esta nueva normativa, ya que como país exportador, debe estar al tanto en lo que respecta a normas de importación de la UE. Aun cuando este reglamento lleva casi 10 años en vigencia, Chile sigue recibiendo notificaciones sanitarias por residuos de plaguicidas en productos vegetales exportados a la UE, mayoritariamente de Captan, Metomilo y Sulfitos (Donoso, Tobar, & Jiménez, 2011). Nuestro país debe poder responder a las exigencias de los mercados respecto a la inocuidad en la comercialización de frutas y hortalizas, así como también se deben verificar las prácticas de uso y manejo de plaguicidas tanto a nivel predial como a nivel de proceso, para fines de fiscalización de plaguicidas. (Donoso, Tobar, & Jiménez, 2011). Convenios como el de Basilea (Donoso, Tobar, & Jiménez, 2011) controlan los movimientos transfronterizos de desechos peligrosos y su eliminación, es decir no será posible importar o exportar algún producto que posea algún desecho considerado peligroso. Este convenio se relaciona con el ámbito agrícola, ya que en la lista de desechos prohibidos caen muchos resultantes de la producción de plaguicidas, biocidas y fertilizantes químicos. También, el Convenio de Estocolmo, más conocido como convenio de los COPs (Compuestos orgánicos persistentes), el cual previene el daño de estas sustancias tóxicas sobre el medio ambiente y la salud humana. Nuevamente los plaguicidas son una categoría de las sustancias sujetas a este convenio. Así, existen aún más protocolos internacionales como el Convenio de Viena y el Protocolo de Montreal que regulan y limitan el uso de plaguicidas o fertilizantes químicos (Donoso, Tobar, & Jiménez, 2011).

En lo que respecta a fertilizantes químicos, en Chile aún no existe una normativa que regule el uso de estos productos en cultivos con comercialización nacional, pero se vislumbra que se adoptaran las tendencias ya nombradas de la UE. A pesar de que aún falta mucho por regular, Chile ha comenzado a incentivar poco a poco los cambios necesarios para disminuir la contaminación de los suelos agrícolas y mejorar la calidad de los alimentos que produce. Desde el año 2000 a la fecha, las políticas de Estado referentes a la agricultura señalan, la necesidad de hacer posible, los cambios de leyes y normativas que permitan mejorar la economía y la seguridad de los productos alimenticios.

La problemática frente al uso de fertilizantes y controladores químicos es evidente e inminente, por lo que buscar una alternativa competente es de gran importancia. Estos sistemas convencionales de producción agrícola basados en químicos, han creado muchas fuentes de

contaminación que, directa o indirectamente, pueden contribuir a la degradación del suelo, del medio ambiente y la destrucción de la base de nuestros recursos naturales. Es por esto, que nace la necesidad de crear insumos agrícolas amigables con el medio ambiente y que sean compatibles con el ecosistema en general, pero que aun así, sean eficientes y efectivos. Una posible solución a esta problemática es el uso de insumos biológicos a base de microorganismos benéficos en la protección de cultivos y conservación de recursos naturales. Desde el punto de vista de una agricultura sostenible, el empleo de productos elaborados a partir de microorganismos con potencial biofertilizante y biocontrolador, representa una importante alternativa para limitar el uso de abonos químicos (Gómez, 2000).

Los microorganismos del suelo se pueden diferenciar entre benéficos y dañinos de acuerdo a sus funciones o efecto en la calidad, productividad, crecimiento y sanidad de las plantas. Entre los microorganismos benéficos están aquellos que por ejemplo fijan nitrógeno, descomponen desechos y residuos orgánicos, desintoxican el suelo de pesticidas, combaten enfermedades de las plantas y otros patógenos del suelo, incrementan el reciclaje de nutrientes y producen compuestos bioactivos como vitaminas, hormonas y enzimas que estimulan el crecimiento de las plantas (Higa & Parr, 1994).

Si bien los insumos biológicos a base de microorganismos se pueden dividir en 3 categorías, en este trabajo se clasificaran en 2: biofertilizantes - bioestimulantes y biocontroladores.

Los biofertilizantes son insumos formulados con uno o varios microorganismos, los cuales, de una forma u otra, proveen o mejoran la disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a los cultivos. De preferencia su aplicación se utiliza como un sustituto parcial y en conjunto con otros fertilizantes. De acuerdo a los microorganismos más estudiados y a su acción biofertilizante, destacan características como capacidad de fijar nitrógeno diazotrófico, solubilizar fosfatos y otros micro y macro nutrientes, así como también capacidad de acelerar la digestión de materia orgánica. Como bioestimulante se entiende a microorganismos productores de alguna sustancia o metabolito que promuevan el crecimiento del cultivo o de la planta. Dentro de esta categoría se encuentran microorganismos productores de vitaminas, fitohormonas, aminoácidos, entre otros. De esta categoría las bacterias del género *Rhizobium* y *Azospirillum* son las más comercializadas, siendo principalmente usadas en leguminosas y

gramíneas respectivamente. Cabe destacar que aún existe una amplia variedad de hongos y bacterias por estudiar y determinar su potencial biofertilizante.

Por otra parte, tal como dice su nombre, los biocontroladores controlan las poblaciones de otros organismos no deseados, ya que éstas pueden causar enfermedades a la planta, suprimir la absorción de nutrientes, destruir sus raíces, etc. Los biocontroladores pueden ser utilizados en principio de forma paralela con el uso convencional de plaguicidas; de esta misma manera, los biofertilizantes también pueden ser utilizados como una herramienta adicional o extra para optimizar las mejores prácticas del manejo de suelo y cultivo (Higa & Parr, 1994). Un concepto que es muy usado en la agricultura actual es el manejo integrado de plagas (MIP) (Dreistadt, 2007), el cual consta de un conjunto de técnicas amigables con el medio ambiente para combatir estos fitopatógenos, siendo el control biológico una de ellas. Tanto el género *Bacillus* como *Trichoderma* llevan la vanguardia como bioplaguicidas, habiendo sido estudiados por su eficacia y amplia aplicabilidad, dependiendo de la especie será el cultivo a aplicar.

En Chile existen numerosas experiencias exitosas en uva de mesa, vid vinífera, paltos, arándanos y otros frutales no orgánicos, en los que el control de plagas se ha logrado por completo en base a sistemas de control biológico, pero aun así menos del 1% de la superficie total de producción frutal en Chile usa estos controladores biológicos (ANASAC, 2013). Pese a que el uso de controladores biológicos durante la última década no es masivo en Chile para prevenir la presencia de plagas y frenar su proliferación, la tendencia indica que sus importaciones aumentan alrededor de un 10% anual, además surge como una opción para satisfacer y responder a las exigencias de los mercados internacionales, importantes en el ámbito económico de las exportaciones del país.

Hoy en día, existe una tasa muy baja de producción nacional de estos bioinsumos a base de microorganismos y expertos señalan, que las razones principales de que este mercado sea aun tan pequeño son por falta de normativa, por falta de capacidad técnica y falta de financiamiento. Es por eso que la demanda nacional es básicamente suplida de las importaciones, provenientes mayoritariamente de Australia, Estados Unidos, México y Colombia.

1.2 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes ya nombrados, es que se estudiará la pre factibilidad técnico-económica de instalar una planta productora de microorganismos para su uso en agricultura en Chile. Se definen, además, los siguientes objetivos específicos:

- Disponer de un estudio de mercado de microorganismos eficientes para la agricultura a nivel nacional.
- Seleccionar el microorganismo y el proceso requerido para su producción.
- Disponer de la evaluación técnica para la producción del microorganismo seleccionado.
- Disponer de la evaluación económica y un análisis de sensibilidad del proyecto.

CAPÍTULO 2 ESTUDIO DE MERCADO, CAPACIDAD Y UBICACIÓN DE LA PLANTA

En esta sección, se revisa la situación de los productos en base a microorganismos benéficos para la agricultura en Chile, y su participación en el mercado. Luego, se procede a realizar la selección de los tipos de microorganismos a producir, para posteriormente, analizar el consumo y la demanda potencial, mostrando una proyección del uso de estos productos en el futuro y las aplicaciones más importantes, señalando las alternativas del mercado consumidor. Por último, de acuerdo a las conclusiones obtenidas del estudio de mercado, se presenta la capacidad de la planta y su ubicación más favorable.

Previo a realizar el estudio de mercado y la selección de los microorganismos a producir, es importante tener en cuenta, que en el suelo existe una variada población microbiana, en la cual existen microorganismos benéficos, que mejoran la calidad y la disponibilidad de nutrientes protegiendo a las plantas, y microorganismos dañinos, que fomentan la aparición de enfermedades y plagas. Dentro de los microorganismos benéficos, o también llamados eficientes, existen innumerables especies, siendo las interacciones entre ellos y las plantas muy variadas. Estos microorganismos, se caracterizan principalmente, por realizar funciones como la fijación del nitrógeno, la solubilización del fósforo insoluble presente en el suelo, la estimulación del crecimiento y el desarrollo vegetal, el reciclaje de residuos orgánicos y el control de microorganismos dañinos. Todas ellas, de suma importancia para el normal establecimiento y aumento de la productividad de especies cultivables de importancia económica (Higa & Parr, 1994).

En la literatura, existen diferentes formas de clasificar los microorganismos benéficos utilizados en agricultura, siendo la más común la que destaca 3 distintos grupos de acuerdo a su aplicación en agricultura, Biofertilizantes, Bioestimulantes y Biocontroladores.

Los microorganismos que tienen la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y digerir la materia orgánica del suelo pueden ser utilizados en agricultura como biofertilizantes y se pueden aplicar a las semillas o al suelo, con el objetivo de incrementar el número de éstos en

el medio y acelerar los procesos microbianos, de tal forma que se aumenten las cantidades de nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas o se hagan más rápidos los procesos fisiológicos que influyen sobre el desarrollo y el rendimiento de los cultivos (Dibut & Martínez, 2004). De preferencia, su aplicación se utiliza como un sustituto parcial y en conjunto con otros fertilizantes.

Los microorganismos con capacidades bioestimulantes, son microorganismos que producen sustancias fisiológicamente activas como fitohormonas (auxinas, giberelinas y citocininas), aminoácidos y vitaminas que al interactuar con la planta promueven o desencadenan diferentes eventos metabólicos en función de estimular el crecimiento, el desarrollo y el rendimiento de cultivos económicos (Dibut & Martínez, 2004).

Por otra parte, tal como dice su nombre, los biocontroladores controlan las poblaciones de otros organismos no deseados, ya que éstas pueden causar enfermedades a la planta, suprimir la absorción de nutrientes, destruir sus raíces, etc. Los biocontroladores, sin dañar las plantas y sin generar resistencia, se han convertido en una alternativa al uso de plaguicidas, y se utilizan como una herramienta adicional para optimizar las mejores prácticas del manejo de suelo y cultivo (Higa & Parr, 1994). Un concepto que es muy usado en la agricultura actual es el manejo integrado de plagas (MIP), el cual consta de un conjunto de técnicas amigables con el medio ambiente para combatir estos fitopatógenos, siendo el control biológico una de ellas.

Esta clasificación no es excluyente, es decir, que existen microorganismos que pueden cumplir varias funciones, directa o indirectamente. Así por ejemplo, muchos microorganismos que actúan como biocontroladores, pueden ser considerados como bioinoculantes de manera indirecta, ya que además de proteger contra diversas enfermedades, contribuyen a mejorar la nutrición y estabilidad del suelo (Bashan Y. , 1998), sin embargo, aun así se consideran biocontroladores ya que su uso se dirige preferentemente al control de plagas. Así mismo, los microorganismos que actúan como promotores del crecimiento de las plantas, al mejorar la nutrición del suelo, ayudan al fortalecimiento de éstas y la hacen más resistente contra plagas y otros efectos adversos como sequedad y salinidad, siendo el biocontrol una consecuencia indirecta de sus acciones.

Como se puede observar en la Tabla 2.1 algunas especies del género *Bacillus spp.*, se caracterizan por cumplir con las tres funciones, siendo preponderante en la mayoría de las cepas, la función de biocontrolador.

Tabla 2.1 Especies del género *Bacillus spp.* y sus actividades relacionadas

Especie	Actividad relacionada descrita
<i>B. amyloliquefaciens</i>	BC-FH
<i>B. cereus</i>	BC
<i>B. circulans</i>	BC
<i>B. licheniformis</i>	BC-FH
<i>B. megaterium</i>	PSB-BC
<i>B. pumilus</i>	BC-FH
<i>B. subtilis</i>	BC-FH
<i>B. thuringensis</i>	BC
<i>Brevibacillus spp.</i>	BC
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	FN, FH, PSB

Fuente: Adaptado de Benintende, 2010

BC= bicontrolador, FN= fijador de nitrógeno, FH= productor de fitohormonas y PSB= solubilizadoras de fósforo.

Los microorganismos que son capaces de aumentar el crecimiento y productividad de las plantas han sido estudiados por más de un siglo. Ya a fines del siglo XX había más de 4000 publicaciones acerca de este campo y la mayoría de los estudios realizados eran para caracterizar nuevas especies que no pertenecían a ningún grupo previamente definido hasta esa fecha. Esto contribuyó a una gran confusión respecto de la clasificación y terminología (Bashan & Holguin, 1998). En la actualidad, existen en el mercado muchos productos en base a los mismos microorganismos, pero que se venden para distintas funciones. El problema se genera, en cuanto no hay un consenso en la terminología tanto en las publicaciones, como en los productos comerciales, lo cual puede generar grandes confusiones al momento de interpretar la información. Es por esta razón, que a modo de facilitar la comprensión, se ha decidido acotar el estudio de mercado presentado en esta sección, en dos grandes grupos, biocontroladores y bioinoculantes. El término bioinoculante se define como todo producto cuyo principio activo sean microorganismos no patógenos, que favorecen la nutrición y/o el desarrollo de las plantas, es decir, biofertilizantes y bioestimulantes, excluyendo los denominados agentes de control biológico (Red BIOFAG, 2008).

2.1 MERCADO DE BIOCONTROLADORES

Primero, se debe aclarar que en la naturaleza existen muchos microorganismos, de los cuales sólo muy pocos son realmente dañinos. Todo insecto tiene a otro insecto, o a otro ser vivo, que lo controla de diversas maneras, es su “controlador” o “enemigo natural”. En la naturaleza el control es interno, en la agricultura convencional el control es externo, es el productor el que hace el control de las plagas, enfermedades y malezas. Como la agricultura intensiva agota los suelos y la biota, se han ido perdiendo estos enemigos naturales, quedando sólo los microorganismos más resistentes. Estos organismos que permanecen, son generalmente los causantes de enfermedades, por lo que es de gran importancia devolver sus enemigos naturales al ecosistema (SAG, 2013). En el mercado existen distintos tipos de biocontroladores dependiendo del tipo de plaga en cuestión, entre los más importantes se encuentran los insecticidas, fungicidas y herbicidas.

Del grupo de los fungicidas el género *Trichoderma* destaca por ser el más estudiado y utilizado debido a su gran efectividad y buen desempeño contra hongos fitopatógenos del suelo. Se conocen alrededor de 135 especies, de las cuales solo un 10% son aplicadas a biocontrol, siendo las más utilizadas *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. parceramosum*. Sus especies presentan diferentes modos o mecanismos de acción que le permiten el control de los fitopatógenos, dentro de los cuales se encuentran: competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno y resistencia inducida, que es una forma de defensa de la planta que involucra cambios metabólicos a consecuencia de procesos de reconocimiento entre la planta y patógeno (Madriz, 2002). Este hongo, también, promueve el mejoramiento de la germinación de semillas, la protección contra los hongos que atacan las raíces de plantas, además de estimular la resistencia de la misma. Estudios demuestran la efectividad de la cepa *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum* frente a *Phytophthora capsici* en cultivos de pimentones (Aviles, Borrero, Casanova, Segarra, & Trillas, 2013), (Ezziyani, Pérez, Requena, & Sid, 2004). La *Botritis cinérea* es la principal enfermedad que afecta a la vid en Chile y también es causada por un hongo patógeno. El control biológico de *B. cinérea* mediante antagonistas específicos, también, es posible mediante cepas de *Trichoderma harzianum*.

Otras enfermedades de gran repercusión en cultivos chilenos que pueden ser tratadas con el género *Trichoderma* son la Monilinia (tizones de la flor), en frutales, parronales y berries, Plateado (*Chondrostereum purpurem*), Fusarium (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*), Enrollamiento clorótico (*Fomitiporella vitis*), Pudrición ácida (*Geotrichum candidum*), Tizón temprano (*Alternaria solani*), Cladosporium (*Cladosporium fulvum*) y *Venturia* (*Venturia inaequalis*) (SAG, 2014).

Otros microorganismos con gran potencial biocontrolador son las bacterias del género *Bacillus*, cuyo mecanismo de acción para combatir enfermedades de las plantas son la competición por el nicho ecológico - sustrato en la rizósfera, producción de sustancias inhibitorias e inducción del llamado "SAR" (resistencia sistémica adquirida). Como ya es conocido, las nuevas tendencias mostradas por las exigencias de los mercados agrícolas internacionales, y en menor medida de los locales, restringen el uso de plaguicidas, ya sea por la adopción de sistemas de producción integrada o bien, orgánica. Esta tendencia ha sido aún más crítica en el manejo de enfermedades bacterianas, dada la aparición sistemática de resistencia a los antibióticos usados, no sólo en agricultura sino, también, en salud humana. Lo anterior ha generado la búsqueda de una nueva gama de antibióticos alternativos, y el uso de los tradicionales se ha restringido en las actividades ajenas a la medicina, tales como la agricultura y ganadería. Es ahí donde el género *Bacillus* gana poder con su función antibacteriana. Cabe señalar, también, que el género *Bacillus* presenta el mayor número de especies conocidas con propiedades insecticidas, entre las cuales destaca *B. thuringiensis*.

B. subtilis y *B. thuringiensis* son los 2 géneros con mayor difusión y abundancia en el mercado de bioplaguicidas, esto en gran parte por su efectividad y amplio control, además de poseer una alta adaptación a diferentes condiciones de pH, temperatura y humedad.

B. subtilis presenta tanto acción fungicida como bactericida; es antagonista del Mildiu (*Pernospora parasítica*), enfermedad causada por protistas que ataca cultivos como la vid y trigo, los cuales son de gran importancia en nuestro país. También, actúa contra el hongo que causa Oidio (*Erysiphe necator*) que afecta principalmente la vid y frutales como manzanos, ciruelos y durazneros, además de fresas, tomates e incluso plantas de jardín (Cruz, 2004). Se ha comprobado que cepas de *B. subtilis* presentan control sobre bacterias fitopatógenas de

frutales y hortalizas de los géneros *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Xanthomonas* y *Clavibacter* entre otros (Bioinsumos Nativa, 2014).

B. thuringiensis sintetiza una toxina durante su condición de endospora, la cual al ser ingerida por su atacante provoca parálisis del tracto digestivo y por lo tanto la muerte. Una de las ventajas de los biopreparados a base de *B. thuringiensis* es que tiene bajas posibilidades de desarrollar resistencia debido a que la endotoxina tiene un tiempo de permanencia muy corto en el medio ambiente y es altamente específica. Es por esta razón que se utiliza principalmente por su efecto insecticida, presentando amplio control sobre una gama de lepidópteros y también por su acción nematocida. Los principales antagonistas son caracoles (*Helix aspersa*), burritos (*Naupactus xanthographus*) y estados larvales de lepidópteros (*Proeulia auraria*, *Proeulia chrysopteris*, *Cidia pomonella*, *Grapholita molesta*) siendo el más importante de todos *Lobesia botrana* (SAG, 2014).

Otro grupo importante del género *Bacillus* son las bacterias solubilizadoras de fósforo, como *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pulvificiens*, *B. circulans* y *P. polymyxa* (Rojas, Holguin, Glick, & Bashan, 2001), las que si bien pueden ser consideradas como biocontroladores, presentan, además, la función de biofertilizante.

La mayoría de las veces la aparición de estas enfermedades causadas por hongos, insectos o nemátodos están causadas por abonos excesivamente cargados de nitrógeno, condiciones de poca luz, exceso de humedad, abuso de tratamientos químicos, o una mezcla de éstas causas. Esto podría concluir que si bien el uso de controladores biológicos es necesario, también lo es, y en mayor importancia, la prevención de esta serie de condiciones que desencadenan estas enfermedades, pudiendo ser una posibilidad la inoculación de microorganismos biofertilizantes y bioestimulantes.

2.1.1 Oferta de biocontroladores en base a microorganismos

El mercado nacional de biocontroladores a base de microorganismos se puede subdividir en dos grandes grupos, cuando estos productos biológicos son fabricados en Chile y cuando son importados desde el extranjero.

a) Oferta Nacional

Actualmente existen muchas empresas productoras de controladores biológicos en el país, las cuales han ido aumentando considerablemente en la última década; hoy Chile tiene un registro de alrededor de 16 empresas que producen biocontroladores ubicadas desde la V hasta la VIII región. Las empresas más importantes y con más renombre en el rubro se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Empresas nacionales productoras de biocontroladores

Empresas	Región
Biocontrol	V
Xilema	V
Rojasi	V
Biorend	RM
Avance biotechnologies	RM
Biogram	RM
Insumos BioNativa	VII
Mip Agro	VII
Biocaf	VIII
Biomycota	VIII

Se debe destacar que no todas las empresa nacionales cuentan con canales de difusión, ya sea página web, correo electrónico y otro medio de comunicación, por lo que la información y contacto a ellas es bastante difícil. La información obtenida en esta sección fue obtenida por otras revisiones o estudios de mercado, visitas a expertos y contenidos e información vía internet. De todas las empresas, destacan Biogram, Xilema, Biopacific y Bioinsumos Nativa. Xilema se caracteriza por ser una de las primeras empresas en el país originada en 1995, pertenece a la firma Anasac cuya experiencia en el mercado de insumos silvoagropecuarios

supera los 60 años, formula, comercializa y distribuye controladores biológicos a base de insectos benéficos que tengan acción insecticida. Una apuesta distinta y quizá, más convencional, es la de empresas como Biogram, Insumos BioNativa y Biopacific, que fabrican biocontroladores a base de microorganismos. Biogram cuenta tanto con biofertilizantes como con biocontroladores, dentro de ellos biofungicidas, biobactericidas y bioinsecticidas. Bioinsumos Nativa es una empresa que nace de la iniciativa de dos jóvenes tesisistas cuyo proyecto de título estaba enfocado a la producción de controladores biológicos, terminando hoy en una de las empresas con más renombre a nivel país, abarcando el 50% del mercado de biocontroladores en Chile (COAGRA, 2012). La empresa con 4 productos: un bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis*, un biofungicida a base de *Trichoderma spp.*, un biobactericida a base de *Bacillus spp.* y un estimulante biológico *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.* Biopacific nace en Santiago mediante una alianza entre la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y un grupo de inversionistas en el año 2007. La empresa también cuenta con los 2 tipos de controladores, a base de *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.* Las demás empresas también producen biocontroladores a base de *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.*, pero destacan, además, especies del género *Agrobacterium* y *Metarhizium*, entre otros. Algunos de estos productos de origen nacional se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Biocontroladores en base a microorganismos producidos en Chile

Nombre Comercial	Ingrediente Activo	Fabricante
Nacillus	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Brevibacillus brevis</i>	Bioinsumos Nativa Ltda.
Trichonativa	<i>Trichoderma spp.</i>	Bioinsumos Nativa Ltda.
BETK-03	<i>Bacillus thuringiensis var. Kurstakis</i>	Bioinsumos Nativa Ltda.
Biobacter 84	<i>Agrobacterium radiobacter</i> cepa K84	Biogram
Harztop	<i>Trichoderma harzianum</i>	Biogram
Metagram SV	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Biogram
Baciforte	<i>Bacillus subtilis</i> (<i>B. Methylophilicus</i>)	Biopacific
Baciplus	<i>Bacillus subtilis</i>	Biopacific
Trichoforte	<i>Trichoderma atroviride</i> , <i>Trichoderma afroharzianum</i> , <i>Trichoderma pseudoharzianum</i>	Biopacific

Nombre Comercial	Ingrediente Activo	Fabricante
B.T.O	<i>Bacillus Thuringiensis</i>	Sociedad Agrícola Terragenesis
B.S.	<i>Bacillus subtilis</i>	Sociedad Agrícola Terragenesis
Met 21	<i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Beauveria bassiana</i>	Sociedad Agrícola Terragenesis

Fuente: Elaboración propia con información obtenida de los catálogos virtuales de productos de cada empresa mencionada.

En Chile existen sólo 9 patentes de insumos ecológicos registradas en el país, de las cuales 5 fueron solicitadas por EE.UU., 1 por Nueva Zelanda y 3 por Chile. En 1984 se encuentra la primera patente registrada a nivel nacional, solicitada por EE.UU. la cual consta de un método para encapsular plaguicidas biológicos a base de polímeros polihidroxiados. 3 patentes involucran microorganismos genéticamente modificados, otra involucra una cepa de *Ulocladium*, hongo con capacidad secretora de una enzima que presenta actividad de control biológico y la última consta de un nematocida a base de residuos biológicos ricos en materia orgánica (Donoso, Tobar, & Jiménez, 2011).

Recién para el año 2009 se cuenta con la primera patente nacional para un bioplaguicida - bioestimulante y luego el año 2010 se registra una patente para un insecticida y otra para un fungicida. Las especificaciones de cada patente concedida a autores nacionales se describen en la Tabla. A.1, Apéndice A.

Se debe destacar que en las patentes con solicitud chilena no se encuentra ninguno de los productos de la Tabla 2.3, lo que podría parecer un poco ilógico en lo que refiere a la protección y replicación de la propiedad intelectual. Es por eso que la mayoría de los productos son en base a las mismas especies de bacterias y hongos y la variedad que se encuentra hoy en el mercado de biocontroladores no es amplia.

El año 2009 se inauguró el Centro Tecnológico de Control Biológico gracias a un fondo regional Corfo y en la actualidad opera mediante proyectos de investigación concursables financiados fundamentalmente por Innova Corfo, FIA y FONDEF, además de ser dependiente del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) división Quilamapu. El CTCB es el centro de investigación en Control Biológico más grande del país y se dedica exclusivamente a la

investigación aplicada en esta área. Este centro busca crear alternativas limpias para combatir plagas y enfermedades agrícolas y forestales, mediante el uso de organismos vivos, entre los que se encuentran insectos, hongos y nemátodos entomopatógenos.

Es importante recalcar que no existe información disponible sobre la comercialización, venta y producción de estas empresas nacionales. Si bien la existencia de empresas dedicadas al rubro de producción de insumos biológicos a base de microorganismos es amplia, la especificidad tanto de bacterias como hongos utilizados no es mucha. Esto puede recaer en un problema de I+D, donde puede ser que la investigación nacional es poca y escasa, o bien ésta existe, pero el desarrollo que debería suceder a la investigación es frenado por problemas de índole económico o tecnológico. Es necesario investigar en nuevas cepas de microorganismos controladores de plagas y enfermedades, así como también, crear una base de datos de los distintos microorganismos que existen y son usados en el país o en el extranjero, especificando las cualidades de cada uno y la acción frente a determinado fitopatógeno.

b) Importaciones

A partir de las partidas arancelarias provistas por Aduana se realizó un profundo análisis concluyendo que la partida correspondiente a controladores era la número PDA.3808.91 y PDA.3808.92. A partir de ambas partidas se pudo realizar una estimación de las importaciones de controladores biológicos, su procedencia, CIF, cantidad, entre otros.

En el marco internacional existe una amplia variedad de controladores biológicos, donde la mayoría de los productos que entran a nuestro país provienen de México y EE.UU. Empresas multinacionales como Bayer lideran en tecnología, avances e investigación en lo que refiere a control biológico.

A continuación se presenta una tabla con los productos y su ingrediente activo más importados respecto del CIF. Para más detalles ver Tabla. A.2, Apéndice A.

Tabla 2.4 Composición de productos biocontroladores con mayor CIF (US\$) de importación

Nombre Comercial	Organismo Activo	Distribuidor en Chile (Importador)	CIF US\$
Dipel WG	Bacillus thuringiensis	Valent	1.875.631
Serenade 13,68 SC	Bacillus subtilis	BASF, Arysta Lifescience	1.250.092
Serenade MAX	Bacillus subtilis	BASF, Arysta Lifescience	657.790
Serenade 10 WP	Bacillus subtilis	Arysta Lifescience	394.305
Javelin WG	Bacillus thuringiensis	Mitsui Agro	275.128

Fuente: Elaboración propia con datos extraídos de los Informes de importación de la Aduana Chilena, años 2005 a 2012

Como se puede apreciar, la mayor importación realizada dentro del período que comprende año 2005-2012 corresponde únicamente a cepas del género *Bacillus*, más específicamente, *B. thuringiensis* y *B. subtilis*. Existen otros productos a base de estos 2 microorganismos, cuya representación en las importaciones es muy baja, así como también, otros productos importados contienen hongos tales como *Trichoderma spp.* y *B. bassiana* cuya representación en las importaciones es menor al 2%. Los 3 tipos de Serenade provienen de México, una sede de la empresa Bayer situada en ese país y son productos fungicidas. Javelin WG y Dipel WG son fabricados de EE.UU. y debido a su composición de cepas de *B. thuringiensis* caen en la categoría de insecticidas.

Se debe destacar que no todos los años se importan los mismos productos. Esto puede explicarse porque por ejemplo, el año anterior se importó más de lo vendido, por lo que quedo cierta parte en stock disponible para el próximo año. También, muchas de las formulaciones de estos productos van siendo en parte alteradas, mejor dicho, mejoradas por lo que los productos cambian de nombre y/o su formulación.

De acuerdo al análisis de cada producto por separado durante el período de años mencionado, se llega a la conclusión que todos los productos importados muestran una tendencia al aumento. Dipel WG presenta un CIF US\$ 22.602 el año 2007, aumentado este a US\$ 551.810 al año 2011, gran incremento que demuestra que el mercado chileno esta consiente de la efectividad del uso de controladores biológicos y el daño que producen los agroquímicos al

ecosistema. Así como las importaciones de Dipel WG se han incrementado durante los últimos años, lo han hecho también los productos como se observa en la Fig. 2.1, el cual muestra la representatividad de cada producto respecto del total de biocontroladores importados en unidades de CIF (US\$).

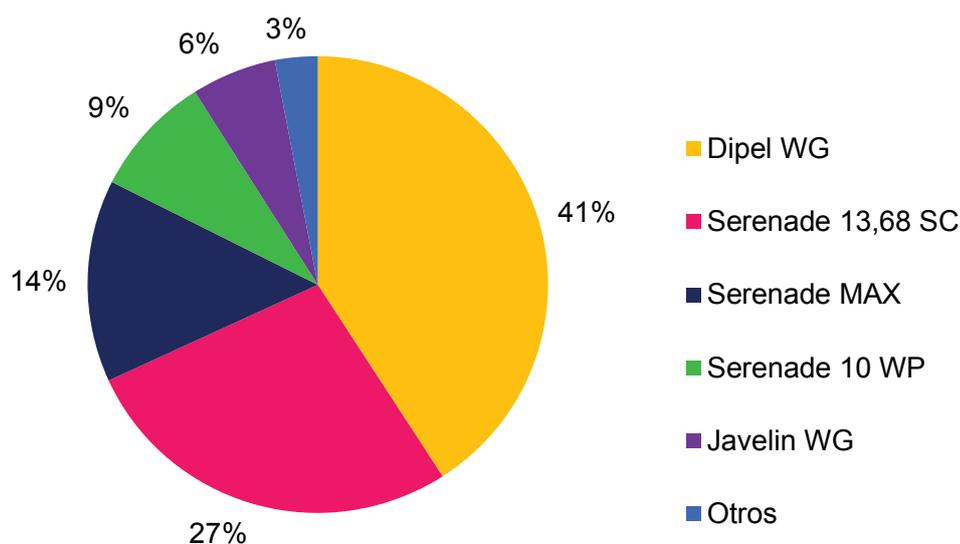


Fig. 2.1 Participación de los principales productos comerciales respecto del total de controladores en base a microorganismos importados

Fuente: Elaboración propia con datos extraídos de los Informes de importación de la Aduana Chilena, años 2005 a 2013

En la Fig. 2.2 se ilustra la variación de las importaciones de biocontroladores respecto a su valor CIF en el período 2005-2013.

Para el año 2005 las importaciones eran alrededor de US\$ 157.907, las cuales fueron incrementando hasta el año 2011, donde se aprecia una fuerte caída en las importaciones. Esto puede deberse a muchos factores, pero hay que considerar que estas tendencias se basan en alzas y bajas, lo que una baja de este tipo no necesariamente indica que el mercado está en descenso. Un factor que responde a esta baja puede ser el hecho del aumento de la producción nacional de biocontroladores. Como ya se mostró en el apartado de oferta nacional las empresas en el rubro no son pocas, y se sabe que cada vez están ampliando tanto su ubicación física como tecnológica e intelectual lo que lleva al desarrollo de mejores controladores y nuevos productos.

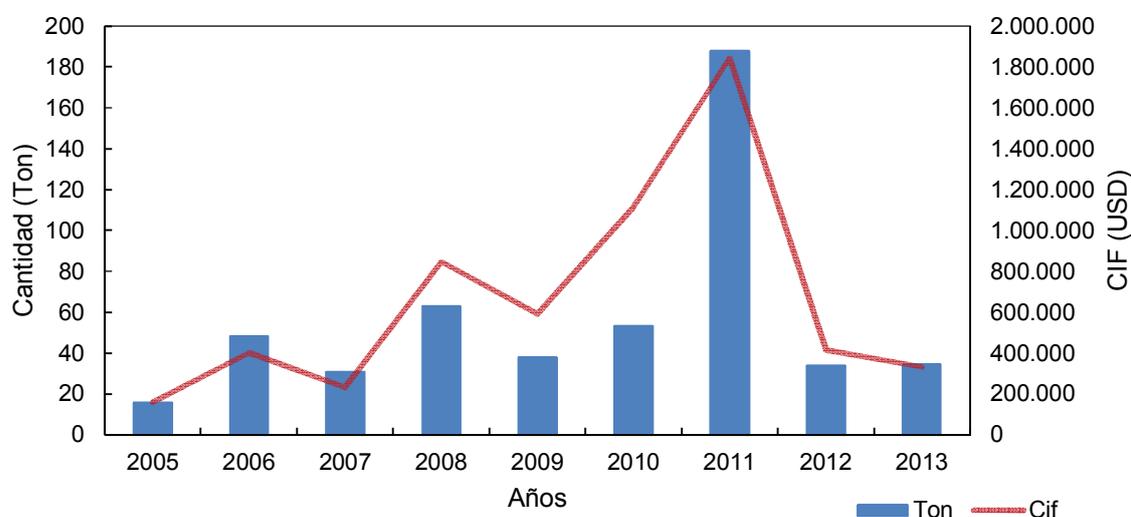


Fig. 2.2 Variación de las importaciones de biocontroladores respecto a su valor CIF en el período 2005 -2013.

Fuente: Elaboración propia con datos extraídos de los Informes de importación de la Aduana Chilena, años 2005 a 2013

La mayoría de estos controladores biológicos al tener acción insecticida y fungicida son destinados a cultivos frutícolas y hortícolas, pero siendo la mayoría utilizados en cultivos frutícolas. Se sabe, además, que la dosis mínima de aplicación de estos productos es de 1 dosis/cultivo, para asegurar la viabilidad y efectividad del producto. Si se considera que estos biocontroladores son únicamente utilizados para cultivos frutícolas, y se considera una dosis de aplicación mínima de 1 dosis por cultivo, para el año 2012 se estaría cubriendo un 5% de las hectáreas totales con las importaciones de biocontroladores.

c) Conclusiones

En el mercado nacional existen alrededor de 16 empresas productoras de insumos biológicos destinados al control de plagas en la agricultura, las cuales han ido evolucionando a lo largo de los años e innovando en lo que son sus productos y tecnologías. Existen muchas iniciativas y fondos tanto del gobierno como de instituciones privadas que impulsan y promueven la realización de mejores y nuevos biocontroladores para el mejoramiento de cultivos con potencial económico y social. Si bien la producción nacional es creciente, se cree que es necesario innovar en lo que refiere al género y especie de microorganismos, para lo que es

necesaria la investigación tanto en terreno como en laboratorio. Es indispensable hacer una investigación profunda con nuevas cepas con potencial controlador o determinar nuevas cepas que respondan a enfermedades o plagas específicas que todavía no han sido cubiertas.

Se cree que el mercado de biofertilizantes es mucho más atractivo en término del mercado nacional, ya que existen menos empresas productoras de estos productos; en teoría habría un mercado más grande que abarcar si se habla de productos con propiedades inoculantes.

Es por estas razones que se decide rechazar la propuesta de realizar una planta productora de microorganismos destinados al control biológico en el área de agricultura y continuar con el estudio de mercado de biofertilizantes a base de microorganismos. Más no es necesariamente un proyecto poco atractivo, debido a que para el desarrollo del trabajo es necesario elegir uno de los dos caminos.

2.2 MERCADO DE BIOINOCULANTES

Dentro de los principales microorganismos que tienen capacidad de fijación de nitrógeno, se encuentran los de las especies *Rhizobium* sp; *Bradyrhizobium japonicum* que actúan de forma simbiótica con las plantas. Estas bacterias llevan a cabo la transformación de N₂ a amonio en los nódulos formados en las raíces de las plantas y se consideran como estructuras distintivas de las leguminosas. Mediante este mecanismo estas bacterias logran suplir entre el 80 y 100% de las necesidades de nitrógeno en las leguminosas (Dibut & Martínez, 2004; Ferlini, Díaz, & Traut, 2005).

Otro tipo de microorganismos fijadores de nitrógeno, son bacterias que se asocian sin necesariamente penetrar al sistema radical de las plantas, atraídas por un conjunto de exudados que actúan como fuente de carbono y energía. Ejemplo de estas especies, son *Azotobacter* spp., *Herbaspirillum* spp., *Azospirillum* spp., *Azolla* spp., *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Burkholderia* (Okon, 1985; de Bashan, Holguin, Glick, & Bashan, 2007). A través de esta actividad, estos microorganismos aportan entre el 25-50% de las necesidades de nitrógeno en los cultivos (Elmerich, Zimmer, & Vieille, 1992), logrando aumentar los

rendimientos de los cultivos hasta un 40%. Sin embargo, este valor es bastante relativo, ya que los rendimientos dependen fuertemente del tipo de microorganismo, del tipo de cultivo, del suelo, clima y dosis de aplicación, entre otros factores (Puente & García, 2010). Las especies *Azospirillum spp.* y *Azotobacter spp.*, son dos de las bacterias más estudiadas y se asocian preferentemente a distintos tipos de gramíneas como pastos de forraje, maíz, trigo, arroz y sorgo (Shrimant, 2012; Vital & Mendoza, 2014).

Otra de las funciones importantes de los microorganismos benéficos es la solubilización del fósforo insoluble del suelo. Este es un proceso de extrema importancia para los suelos cultivables, ya que éstos contienen cada vez más cantidades de fósforo no soluble, que se ha acumulado a través de los años por la aplicación excesiva de fertilizantes fosfóricos de origen químico y que sólo es posible recuperar mediante la acción de microorganismos solubilizadores de fósforo, tanto orgánico como inorgánico. En el caso de la solubilización del fósforo orgánico, estos microorganismos, a través de la acción de sus enzimas fosfatasas, pueden aportar a las plantas entre el 30-60% de sus necesidades de este nutriente (Kusey, Jansen, & Legget, 1989; Paul & Clark, 1989). En el caso del fósforo inorgánico, su solubilización es lograda por las bacterias a través de la producción de ácidos orgánicos (ácido glucónico, por ejemplo) que actúan sobre el pH del suelo favoreciendo la solubilización de este elemento, y liberando fosfatos y cationes de Ca^{+2} , Fe^{+2} y Al^{+2} a la solución del suelo (Fernández & Rodríguez, 2005; González G., 2009). Ejemplos de géneros solubilizadores del fósforo en el suelo son: *Bacillus megatherium*, *Paenibacillus polymyxa*, *Azotobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* y *Streptomyces spp.* y *Burkholderia spp.*, entre otros (Dibut & Martínez, 2004).

Los microorganismos con función bioestimulante, como se definió anteriormente, son microorganismos estimuladores del crecimiento, capaces de producir un conjunto de sustancias conocidas como sustancias fisiológicamente activas. Este mecanismo, se distingue por la diferencia existente entre cepas microbianas de mayor o menor eficiencia en la síntesis de estos productos, entre las cuales se destacan las sustancias reguladoras del crecimiento o también llamadas fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas), aminoácidos, péptidos de bajo peso molecular y vitaminas. Estas sustancias, al interactuar en su conjunto con el metabolismo vegetal, provocan diferentes efectos beneficiosos desde el punto de vista agrobiológico, entre los que se encuentran, el acortamiento del ciclo de los cultivos, incremento

entre 5 y 20% del rendimiento y obtención de frutos con mayor calidad comercial. Ejemplo de microorganismos productores de sustancias activas: *Azotobacter spp.*, *Azospirillum spp.*, *Bacillus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Trichoderma spp.* (Dibut & Martínez, 2004).

Por último, otro tipo de microorganismos que han sido ampliamente estudiados son las micorrizas. Las micorrizas son una asociación simbiótica mutualista entre raíces de plantas superiores y ciertos grupos de hongos del suelo. Estos hongos reciben de la planta el suministro de carbono y energía, y la planta a su vez recibe por parte de los hongos nutrientes minerales como nitrógeno, fósforo cobre y zinc, y otros beneficios como la estimulación de sustancias reguladoras de crecimiento, incremento de la tasa fotosintética, ajustes osmóticos, etc. Las micorrizas se subdividen en dos grandes grupos: endomicorriza y ectomicorriza. Las endomicorrizas generan hifas que penetran las células del tejido cortical de la raíz, actuando en calidad de órganos nutritivos. Se pueden encontrar en muchas plantas herbáceas (inclusive muchas plantas de cultivo), también, en plantas leñosas, tales como palmeras, café, té, cacao y cítricos. Las ectomicorrizas generan hifas que envuelven las raíces de la planta, penetrando en el parénquima de la corteza y ubicándose en el espacio intercelular, sin infectar las células. Las ectomicorrizas se encuentran principalmente en coníferas (Biosim EIRL). Algunos estudios señalan que las micorrizas pueden llegar a aumentar rendimientos en el orden del 40% (Clua & Oligati, 2013; Parada, Reyes, & Mera, 2007). Las endomicorrizas más conocidas son las micorrizas arbusculares, caracterizadas por formar arbusculos intracelulares, y siendo las más comunes las especies del género *Glomus spp.*, *Scutelospora spp.*, *Acaulospora spp.* y *Gigaspora spp.* (Goedas, 2010). Las Ectomicorrizas más exitosas son *Pisolithus spp.*, *Rhizopogon spp.*, *Scleroderma spp.*

En resumen, el mercado de los bioinoculantes, es un mercado muy amplio debido a la gran variedad de microorganismos existentes que tienen la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas y de hacer más disponibles los nutrientes en el suelo, estando además, sujetos a variables como el clima, tipo de suelo, tipo de cultivo e interacciones con otros micro y macroorganismos. Esto a su vez, hace que la formulación y dosis de aplicación de cada producto sean muy distintas y con ello, los estudios realizados a nivel de campo a su vez sean muy diversos, entregando grandes variaciones en los rendimientos de los cultivos.

2.2.1 Oferta de bioinoculantes en Chile

La oferta nacional de bioinoculantes microbianos, está compuesta principalmente por dos agentes, los productores nacionales y los importadores, siendo este último grupo el más relevante en cuanto a volumen, calidad, diversidad de formatos, formulaciones y participación de mercado.

a) Oferta Nacional

A escala de producción industrial, se han detectado 7 empresas que fabrican bioinoculantes en base a microorganismos en Chile (ver Tabla 2.5). De las empresas encontradas, todas se dedican principalmente a la producción de biocontroladores u otro tipo de abonos ecológicos (humus, nutrientes, fitohormonas, etc.) y como productos alternativos tienen las líneas de producción de bioinoculantes. La empresa Bionativa señalada en la sección 2.1.1, produce biocontroladores en base a *Bacillus spp.* y *Trichoderma spp.*, y como se señaló anteriormente, ambos géneros pueden tener varias funciones, lo cual le permite a la empresa vender sus productos con estas dos aplicaciones diferentes (biofertilizante y biocontrolador). Como se puede observar en la Tabla 2.5, (con más detalles en la Tabla. A.4, Apéndice A) no existen dos productos similares en composición, siendo en su mayoría de formulación líquida y sus aplicaciones totalmente distintas unas de otras. Se puede apreciar también, que la variedad de los productos elaborados en Chile no es muy extensa si se compara con los productos importados (ver Tabla 2.6), dejando al descubierto que aún no existe un mercado competidor interno muy grande.

Tabla 2.5 Biofertilizantes en base a microorganismos benéficos producidos en Chile

Nombre Comercial	Ingrediente Activo	Fabricante
Raizfort-M	Micorrizas arbusculares	Iona Chile
RV-2-Biocontrolador	Bacterias y actinomicetos	Sociedad Agrícola Terragénesis

Biomongen	<i>Trichoderma spp.</i> y <i>Bacillus spp.</i>	Bioinsumos Nativa Ltda.
Rizofix LV	Bacterias del género <i>Rhizobium</i>	Biogram
A5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>L. plantarum</i>	Avance Biotechnologies
Biotaforte*	Microorganismos nativos	Biopacific
Fertibact	<i>Azotobacter sp.</i> , <i>Azospirillum spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Nitrosomonas spp.</i> , <i>Nitrobacter spp.</i> y <i>Sacharomyces spp.</i>	Ecotecnos Ltda.

Fuente: Elaboración propia con información obtenida de las fichas técnicas de cada producto disponible en la web.

*Producto en desarrollo

En el registro de patentes con origen del solicitante en Chile, sólo se registra una patente actualmente resuelta a nombre de Luigi Ciampi, profesor de la Universidad Austral de Chile (ver Tabla. A.3, Apéndice A), que consiste en la formulación de un producto biocontrolador que además tiene la función de biofertilizante. Otras dos patentes que involucran microorganismos biofertilizantes y bioestimulantes que se pueden destacar, son la patente con año de publicación 2011, actualmente no resuelta a nombre de la empresa Biopacific Ltda, Y la patente con año de publicación 2004 no concedida a nombre de la empresa Ecotecnos Ltda. la cual probablemente corresponde a la descripción del proceso de elaboración del producto Fertibact señalado en la Tabla 2.5.

Hasta el momento, no hay más empresas nacionales que asuman el riesgo de generar uno o varios productos en base a microorganismos, sino que la mayoría las empresas dedicadas a este rubro distribuyen y venden productos fabricados en el extranjero (Parada, 2011). No obstante, aun cuando la fabricación de inoculantes en Chile es muy reducida en variedad y cantidad, es importante destacar que actualmente, en la base de datos nacional de proyectos asociados a los Fondos de Innovación Agraria (FIA) existen 5 proyectos de investigación con relación a biofertilizantes registrados, de los cuales 4 consideran biofertilizantes en base a bacterias y 1 en base a microalgas (FIA) (Tabla. A.5, Apéndice A). Debido a que algunos proyectos aún están en curso, es difícil saber cuál será su alcance en un futuro. Dentro de los proyectos, existen dos (que finalizan el año 2015) que posiblemente podrían significar una competencia: "Generación de un biofertilizante mediante el uso de genómica y

microencapsulación para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile”, a cargo de la Dra. Véronique Amiard, Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola (CGNA), y el proyecto “Implementar una planta piloto para la producción masiva de bacterias solubilizadoras de fósforo” (a cargo de la empresa Agrícola, Forestal y Comercial Ródulo Enrique Rodón, Bioagrotec EIRL. Ninguno de los 2 proyectos revela el tipo de bacterias que se van a utilizar. Sin embargo, el hecho de que el gobierno destine fondos a proyectos de investigación en este rubro, indica que es un tema que ha comenzado a ganar importancia, por lo que se espera que en un corto plazo, se comience a ampliar el mercado de este tipo de insumos.

b) Importaciones

Hoy en Chile, existen en el mercado distintas formulaciones y calidades de bioinoculantes, la mayoría provenientes del extranjero, principalmente de Australia (Parada, 2011). Algunas de las principales empresas productoras de bioinoculantes de diferentes tipos y concentración (en términos de CIF y continuidad de importación) encontradas en los informes de importación de la Aduana y en las páginas de las distintas empresas mencionadas en la Tabla 2.6 (con más detalles en Tabla. A.6, Apéndice A).

Tabla 2.6 Composición de productos inoculantes con mayor CIF (US\$) de importación

Nombre Comercial	Organismo Activo	Fabricante
TwinN	<i>Azotobacter spp.</i> , <i>Azospirillum spp.</i>	Mapleton Agri Biotec Pty Ltd
SoilBuilder	<i>Acidovorax facilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. lentimorbus</i> , <i>B. marinus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Cellulomonas fimi</i> , <i>C.fl avigena</i> , <i>Rhodococcus rhodochrous</i> .	Agricent para Loveland Products Company
RhizoFlo	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Becker Underwood
Oiko Bac – 174	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Pseudomonasspp.</i> <i>Nocardia corallina</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Ecological Resources, Inc.

Nombre Comercial	Organismo Activo	Fabricante
Ecoterra WG	<i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Pseudomona aureofaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus lincheniformis</i> & <i>Bacillus Megaterium</i>	Live Systems Technology S.A.
Oiko Riza E*	Endomicorrizas: <i>Glomus Brasilianum</i> , <i>G. Clarum</i> , <i>G. Deserticola</i> , <i>G. Mosseae</i> , <i>G. Intraradices</i> , <i>G. Monosporus</i> y <i>Giaspora margarita</i>	Ecological Resources, Inc.
Biohealth	<i>Bacillus subtilis</i> , extracto de Algas (<i>Ascophillum nodosum</i>), Ácidos Húmicos (derivados de Leonardita)	Humintech GmbH

Fuente: Elaboración propia con datos extraídos de los Informes de importación de la Aduana Chilena, años 2007 a 2013 y de las fichas técnicas de cada producto disponible en la web.

*Producto importado una sola vez

Cabe destacar que muchas veces las empresas importadoras, no se abastecen de forma constante, sobre todo si se trata de un mercado pequeño, por lo que existe bastante irregularidad y poca continuidad en las importaciones de algunos productos. Por ejemplo, los productos comerciales RhizoFlo y Oiko Riza E, que tienen una alta participación en términos de CIF, sólo registran importaciones los años 2007-2008 y 2007 respectivamente. Otros productos, como Soil Builder o Biohealth, desde el año en que aparecen en el mercado, muestran un comportamiento relativamente constante a pesar de que ambos registran un año intermedio, sin importación. Al no haber regulación en el uso de biofertilizantes de este tipo, y considerando que el registro de los productos en la Aduana permite la omisión de ciertos datos relevantes y esenciales para la recopilación de información, es muy difícil mantener su correcto seguimiento.

Los productos son tan variados en su formulación y presentación, que la relación precio, cantidad y dosis de aplicación puede variar de producto a producto de forma significativa. Así por ejemplo, para TwinN se recomienda una dosis de aplicación de aproximadamente 0,0008 [kg/ha] ya que al ser un producto liofilizado, éste se encuentra muy concentrado, en cambio, para SoilBuilder se recomienda una dosis de aproximadamente 30 [kg/ha] lo que corresponde un promedio de 2 y 100 (US\$ CIF)/ha respectivamente (ver Tabla. A.6, Apéndice A).

Para poder estimar la participación económica en el mercado, se ha considerado el CIF total de cada producto comercial acumulado entre los años 2007 a 2013 obteniéndose una visión general acerca de cuáles son los productos que han tenido mayor importancia comercial en todo el período 2007-2013 (ver Fig. 2.3).

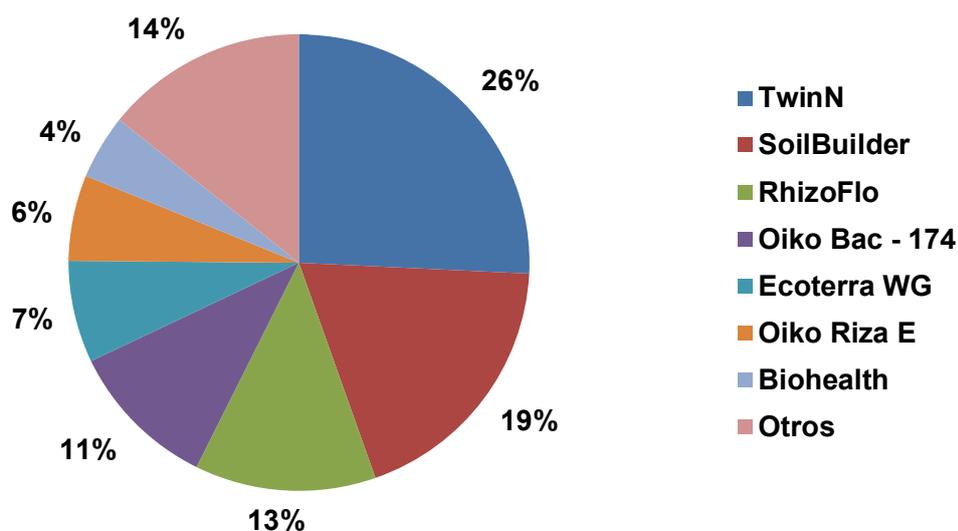


Fig. 2.3 Participación de los principales productos comerciales respecto del total de bioinoculantes en base a microorganismos importados.

Fuente: Elaboración propia con datos extraídos de los Informes de importación de la Aduana Chilena, años 2007 a 2013

En la Fig. 2.3 , se presenta el porcentaje del CIF total (US\$) de cada producto comercial acumulado en el período 2007 -2013. Se puede observar, que el producto comercial TwinN de la empresa Mapleton Agri Biotec de Australia, importado y distribuido por Am Ecological Chile, es el biofertilizante en base a microorganismos fijadores de nitrógeno (*Azotobacter spp* y *Azospirillum spp*) que hasta el momento, ha tenido mayor relevancia en términos de US\$ CIF.

Es importante destacar, que la participación en el mercado de estos productos (en US\$ CIF), respecto del total de insumos agrícolas del tipo fertilizantes importados en el año 2013, es del orden del 0,04% (Informes de Importación de Aduanas de Chile, 2013). Estas cifras, revelan que este mercado es un mercado bastante pequeño en relación a todos los productos utilizados como fertilizantes o estimulantes, sin embargo, su participación ha crecido respecto

del año 2007 y de acuerdo a las proyecciones obtenidas y a lo esperado tanto en latinoamérica como en el mundo, pretende seguir creciendo (Parada, 2011).

2.2.2 Caracterización y cuantificación de la demanda de bioinoculantes en Chile

En Chile, el uso y aplicación de inoculantes de tipo microbiano no es una práctica muy común. Hasta hace unos años, se sabía que el uso de biofertilizantes para fines agrícolas estaba prácticamente restringido al grupo de bacterias de los géneros *Rhizobium spp.* como biofertilizantes de leguminosas de granos y forrajeras (Parada, Reyes, & Mera, 2007). La utilización de hongos micorrícicos en los viveros tuvo bastante importancia debido a la gran actividad forestal y a su uso en paltos de exportación. Tanto en los viveros de CONAF (Corporación Nacional Forestal) como en los viveros de las empresas forestales más importantes en el sur del país, las plantas de pino y de eucalipto han sido inoculadas con micorrizas obteniendo aumentos en la sobrevivencia de 41 y 47%, respectivamente (Parada, Reyes, & Mera, 2007). Sin embargo, dado a que en Chile no existe un registro nacional acerca del uso de fertilizantes agrícolas (CCO y FIA, 2008), es muy difícil obtener las tendencias de consumo nacional de estos productos de forma directa.

Por otro lado, dado que las empresas chilenas que producen bioinoculantes, se reservan la mayor parte de la información productiva, tampoco es posible obtener valores de producción nacional de estos insumos. No obstante, de acuerdo a lo mencionado anteriormente, la producción nacional se considera muy pequeña en comparación con las importaciones, y claramente, al no haber una alta producción nacional, tampoco hay registro de exportaciones. Es por esto que, para estimar el consumo de estos productos, se considerarán sólo las importaciones realizadas a lo largo del tiempo (a través de los registros obligatorios que deben realizar las empresas para importar un producto), asumiendo que la producción nacional es casi nula.

a) Evolución del tamaño del mercado en base a las importaciones registradas

Las importaciones registradas desde el año 2007 al año 2013, indican que existe un notorio aumento en el consumo de estos productos. La tasa de crecimiento promedio anual en fue de un 24% en toneladas y de un 36% en US\$ CIF.

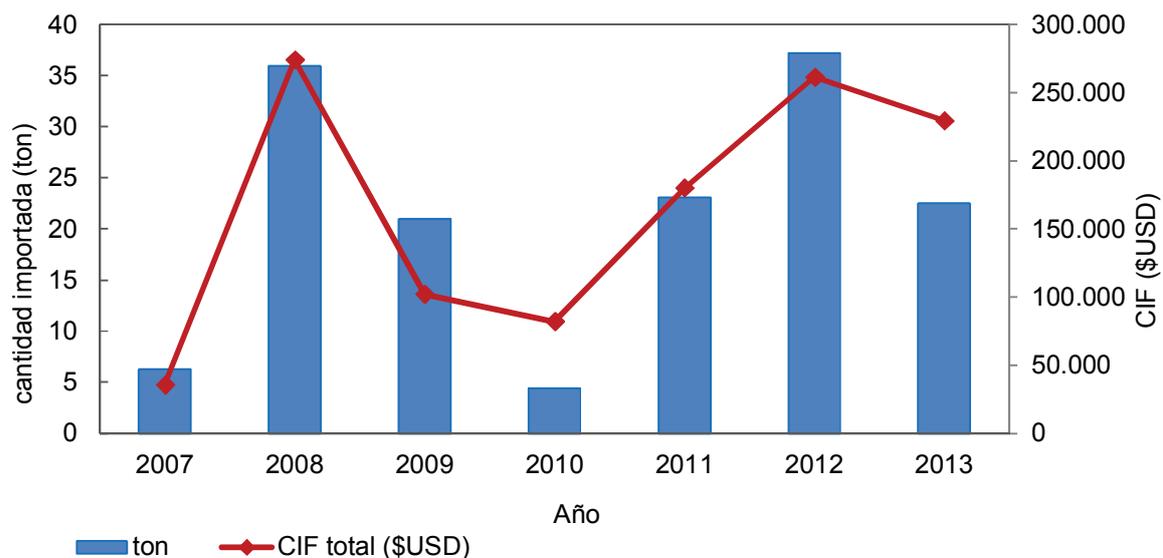


Fig. 2.4 Evolución de las importaciones de bioinoculantes microbianos entre los años 2007 y 2013

Fuente: Elaboración propia con datos extraídos de los Informes de importación de la Aduana Chilena, años 2007 a 2013

Como se puede observar en la Fig. 2.4, el año 2008, se registró un aumento en las importaciones, debido a la participación del producto comercial RhizoFlo (bacterias del género *Rhizobium spp*) de la empresa Becker Underwood y el producto Okio Riza E (endomicorrizas) de la empresa Ecological Resources Inc. (importada por Oikos Chile). Esto se puede deber, a que en el mercado de los fertilizantes sintéticos se evidenció un alza de precios en el año 2007, identificando sus causas principales en un sobre-stock por parte de los principales oferentes de fertilizantes de EEUU, las expectativas de mayor producción de biocombustibles en el año 2006, el cierre de las plantas productoras de fertilizantes nitrogenados en EEUU y por último, el aumento de los costos de transporte. Este incremento de precios continuó hasta el año 2008, debido al desbalance entre la oferta y la demanda mundial de fertilizantes y la instauración de altos impuestos a las exportaciones de fertilizantes en países productores, como fue el caso de China, para asegurar el abastecimiento interno. El precio de importación de los fertilizantes mostró un descenso recién el año 2009 siendo la volatilidad de los precios

de los “commodities” agrícolas y de los fertilizantes, la crisis económica mundial y la caída del precio del petróleo, los factores que incidieron en esta baja (Asesorías Agrícolas y Agroindustriales Ltda. (ASAGRIN), 2010).

Dado el alza de precios de los fertilizantes sintéticos los años 2007 y 2008, es muy probable que este comportamiento haya fomentado la búsqueda de otras alternativas como los biofertilizantes, que no dependen de los precios del combustible y otros factores asociados a los fertilizantes sintéticos, sobre todo los productos antes mencionados, ya que se tiene registro de que en ese tiempo en Chile, estaban siendo utilizados en cultivos de leguminosas y viveros forestales (Parada, Reyes, & Mera, 2007). Luego, los años 2009 y 2010, al disminuir los precios, y al aumentar la disponibilidad de fertilizantes tradicionales, se observó una disminución en la importación de biofertilizantes, lo que se atribuye a un menor consumo de éstos.

A partir del año 2011 se puede observar que hubo una leve alza en las importaciones, para luego en el año 2012 aumentar de manera más significativa. Es probable, que las razones por las cuales se ha visto un aumento en el consumo de estos productos, ya no estén relacionadas al alza de precios de los fertilizantes sintéticos, ya que desde el año 2011 en adelante, los precios de fertilizantes químicos como la urea y el fosfato diamónico en US\$/ton se han mantenido relativamente constantes (Espinoza, 2014). Lo más probable, es que las razones del aumento en el consumo de bioinoculantes, se deba a las nuevas tendencias en el uso de insumos ecológicos, debido a la creciente importancia del concepto de inocuidad alimentaria, aumento en las exigencias de calidad en exportaciones, incentivos a través de los programas de recuperación de suelos degradados, nuevas y mejores prácticas agrícolas, nuevas tecnologías de producción y mayor efectividad y credibilidad sobre los “bioproductos”.

b) Evolución de la demanda en base a las posibles hectáreas cubiertas por los bioinoculantes importados

Para poder visualizar en una misma escala la demanda de los diferentes productos importados, se realizó el cálculo de las hectáreas equivalentes a la cantidad importada por producto (ver Fig. 2.5). De esta forma, se pudo observar en una misma base, la tendencia en

el uso de estos biofertilizantes a partir del año 2007. Dentro de las consideraciones realizadas para este cálculo, se estimó una dosis promedio para cada uno de los productos, se consideró doble aplicación de cada bioinoculante por cultivo, dado que en la mayoría de los casos una sola aplicación no es suficiente, y se asumió que todos los productos importados, fueron finalmente utilizados. Además, se determinó, cuál de los productos importados tuvo un mayor porcentaje de superficie cubierta en ha.

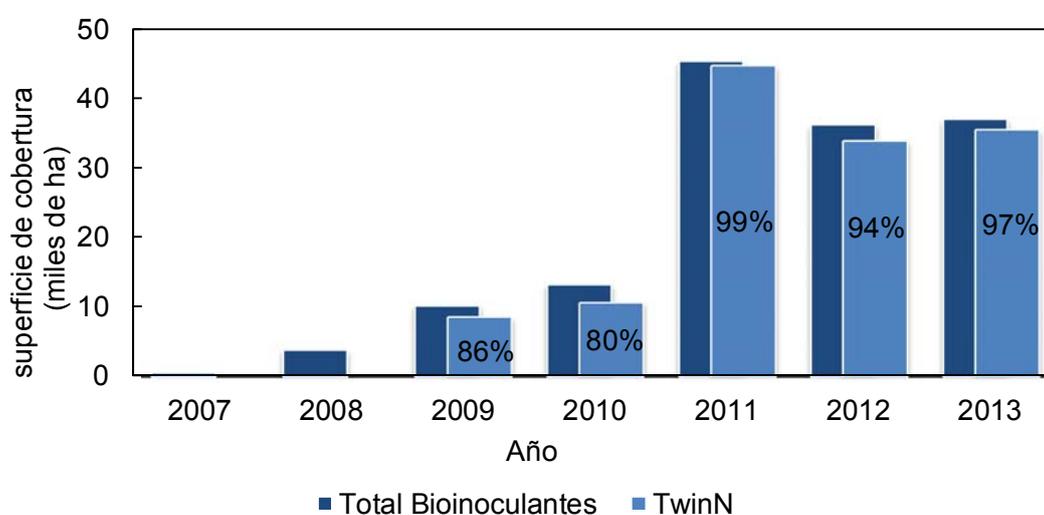


Fig. 2.5 Superficie de cobertura por el total de bioinoculantes importados desde los años 2007 a 2013.

Fuente: Elaboración propia con datos extraídos de los Informes de importación de la Aduana Chilena, años 2007 a 2013

Una vez más, como se puede observar en la Fig. 2.5, el producto TwinN de la empresa australiana Mapleton Agri Biotec, es el producto que tiene la mayor participación. Se puede observar también, que el porcentaje de hectáreas cubiertas aumentó en el tiempo, siendo esta tendencia concordante con el aumento en las cantidades (en toneladas) importadas antes presentada. Es necesario aclarar, que en los años 2007 y 2008 el US\$ CIF/ha promedio de todos los productos importados, era del orden de los 65 US\$/ha y que una vez iniciada la importación del producto TwinN el año 2009, éste bajó al orden de los 7 US\$/ha (ver Fig. 2.6).

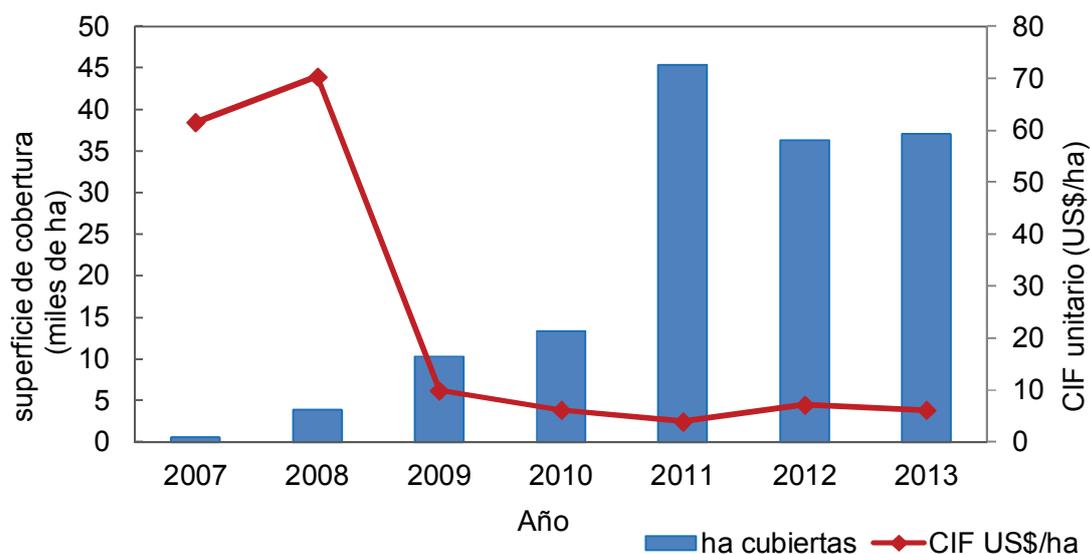


Fig. 2.6 Evolución de las importaciones de bioinoculantes microbianos expresados en superficie de cobertura entre los años 2007 y 2013

Fuente: Elaboración propia con datos extraídos de los Informes de importación de la Aduana Chilena, años 2007 a 2013

Como se puede observar en la Fig. 2.6, el año 2007, había disponible en el mercado una cantidad de bioinoculantes tal, que de haber sido aplicados en su totalidad, se hubiesen logrado cubrir 580 ha. En cambio, el año 2013, se lograron cubrir alrededor de 37 mil hectáreas. Esto significa un aumento de un 6300% en la cobertura de estos productos desde 2007.

2.3 SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Debido a la gran variedad de microorganismos existentes y sus diversas aplicaciones, no es posible comenzar el diseño de una planta productora de microorganismos para agricultura, sin primero seleccionar los tipos de microorganismos a producir. Para su selección, se considerarán los siguientes criterios:

- Se considerarán los microorganismos que actualmente tienen una mayor participación en el mercado de las importaciones, ya que de esta forma se asegurará su demanda.
- Se considerarán aquellos microorganismos de los cuales se tenga una mayor disponibilidad de información en cuanto a pruebas de campo realizadas en Chile y el

extranjero de tal forma de poder asegurar la eficacia del microorganismo seleccionado y los rendimientos que se obtienen tras su aplicación en cultivos.

Dados estos criterios, se han seleccionado dos microorganismos que actualmente se destacan por ser de gran importancia comercial en el mundo de los inoculantes, tanto a nivel nacional como en el extranjero, *Azospirillum brasilense* y *Azotobacter vinelandii*. Las dos especies, se destacan por su función fijadora de nitrógeno y por la producción de fitohormonas estimulantes para el crecimiento de las plantas. Su importancia comercial se destaca, debido a que el producto TwinN mencionado en el capítulo anterior, se compone de estos dos géneros y es el producto que actualmente se importa con mayor participación. Esto demuestra, que la fijación biológica de nitrógeno es una práctica que se está llevando a cabo y que estos dos géneros bacterianos tienen potencial para ser exitosamente distribuidos en Chile.

2.3.1 Acerca de los microorganismos seleccionados

a) *Azospirillum spp.*

El género *Azospirillum* está conformado por bacterias facultativas gram-negativas diazotróficas, de vida libre con capacidad de colonizar los tejidos internos y externos de las raíces (Bashan & Levanony, 1990). Este es uno de los géneros más estudiados y es de particular interés debido a su versatilidad metabólica, a su capacidad para fijar nitrógeno, a la producción de fitohormonas (giberelinas, citocininas y auxinas) (Cassán, Sgroy, Perrig, Masciarelli, & Luna, 2008) y a su capacidad de formar células tipo quistes, las cuales brindan a esta bacteria resistencia a diferentes tipos de estrés ambiental y adherencia a cualquier sistema de raíces. Algunos efectos benéficos de *Azospirillum spp.* en las plantas son incremento en altura, área radicular y rendimiento total de la cosecha (Bashan, Alcaraz-Melendez, & Toledo, 1992). Presenta una amplia distribución geográfica alrededor del mundo y ha sido aislada de la superficie de la raíz de una amplia variedad de plantas y de su rizósfera. Si bien se sabe que las bacterias del género *Azospirillum spp.* se asocian preferentemente a cereales (Puente & García, 2010), (Ferlini, Díaz, & Traut, 2005), éstas no son específicas (Hernández, García, & Ramon, 2001), mejorando rendimientos de otros cultivos como tubérculos (Mapleton Agri Biotec), cultivos industriales (maravilla, raps, tomate, etc) (Felici, y

otros, 2008; Naderifar & Daneshian, 2012) y algunos frutales (Mapleton Agri Biotec) y hortalizas (Abou El-Magd, Zaki, & Abo Sedera, 2014). Las especies más conocidas y estudiadas del género *Azospirillum* son *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans* y *A. irakense*. (de Bashan, Holguin, Glick, & Bashan, 2007).

b) *Azotobacter* spp

Las bacterias del género *Azotobacter*, al igual que *Azospirillum*, son fijadoras de nitrógeno de vida libre. Poseen células gram-negativas, son aerobios estrictos a pesar de que puede crecer en condiciones de baja concentración de oxígeno (Tejera, Lluch, Martínez-Toledo, & González-López, 2005), son de crecimiento heterotrófico y existen especies móviles y no móviles. Ante factores ambientales adversos tales como la desecación y la radiación UV, tienen la capacidad de formar estructuras de resistencias al igual que las del género *Azospirillum* (Joe, et al., 2012). Las especies que más se destacan son *A. chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. beijerinckii*. *Azotobacter* es capaz de fijar a lo menos 10 mg de N por gramo de carbohidrato (Becking, 2006). Además de la fijación de nitrógeno, tiene otras propiedades tales como la capacidad de solubilizar fosfatos, la producción de fitohormonas, de vitaminas y de sideróforos (compuestos quelantes de hierro que actúan como antifúngicos) (Gonzales-López, Salmeron, Martinez-Toledo, Ballesteros, & Ramos-Cormenaza, 1986). Al igual que *Azospirillum*, *Azotobacter*, se asocia preferentemente a cereales (Rubio & Petricari, 2010), sin embargo se han hecho estudios en otros cultivos como leguminosas (Tang, 1995), hortalizas (Jiménez, Montaña, & Martínez, 2011), papas (Araujo, Díaz, Rodriguez, & Pargas, 2014) y frutales (Constantino, Gómez, Álvarez, Pat, & Espín, 2010; Mapleton Agri Biotec).

2.3.2 Co-inoculación de bacterias

Estudios realizados, indican que algunas mezclas de bacterias fomentan la interacción sinérgica entre sí, el aporte de nutrientes, la eliminación de productos inhibidores, y la co-estimulación a través de actividades físicas o bioquímicas que pueden mejorar algunos aspectos beneficiosos de su fisiología, como la fijación de nitrógeno (Bashan, 1998). Dependiendo de la combinación de bacterias y de los cultivos a los que son co-inoculadas,

estas interacciones pueden ser positivas para las plantas, entregando muchas veces mejores resultados que la inoculación de especies individuales.

Muchos autores, han demostrado el efecto positivo de la inoculación de trigo y maíz con *Azotobacter* y *Azospirillum*. Rai y Gaur (1998), estudiaron la co-inoculación de *Azotobacter* y *Azospirillum* y concluyeron que ambas de manera conjunta, aumentan el tamaño de la planta, el rendimiento de grano (toneladas de grano por hectárea), el rendimiento biológico (toneladas de la planta total por hectárea) y el índice de cosecha (peso del grano representado como un porcentaje del peso total de la planta) en diferentes genotipos de trigo. Además, demostraron que con la doble inoculación, se obtiene un mejor rendimiento que al inocular con cada una, por sí sola, aunque ambas formas son efectivas (Rai & Gaur, 1998).

Debido a que este estudio no se centra en la etapa posterior a la inoculación, la co-inoculación no es un aspecto relevante, sin embargo es interesante tomarlo en cuenta y queda a decisión del cliente, la combinación en la aplicación de los productos.

2.3.3 Experiencias en el extranjero

Respecto a otras experiencias en el extranjero, cabe resaltar el caso de Argentina, en donde los cereales, principalmente trigo y maíz, comprenden una superficie sembrada de 8.000.000 y 6.000.000 ha respectivamente, con un 10% de los cultivos inoculados principalmente con *Azospirillum spp.* y algo de *Pseudomonas spp.* (Parada, 2011). En 1994, Okon y Labandera, resumieron los resultados de 20 años de ensayos en Argentina y otros países reportando que la respuesta sobre el rendimiento debido a la inoculación con *Azospirillum* fue positiva en el 60-70% de los casos con un rango de incremento comprendido entre el 5-30%. Posteriormente otros estudios también, describieron sus ensayos realizados con inoculantes en base a *Azospirillum* en cultivos de trigo y de maíz, siendo los resultados positivos pero bastante variables, sin embargo, se vuelve a destacar que la mayoría de los problemas se deben a factores ambientales, limitantes nutricionales, formas de inoculación, dosis empleada, cantidad de materia orgánica, estado fisiológico de la bacteria al momento de inocular, cantidad de microorganismos autóctonos y otros factores similares (Fages, 1994).

En relación al género *Azotobacter spp.*, se han encontrado aumentos en el rendimiento comprendidos entre un 5 % y un 474%. De un total de 12 estudios realizados en distintos países, 9 obtuvieron resultados con rendimientos estadísticamente significativos. El empleo de esta bacteria en Argentina está en pleno proceso de investigación tanto en estudios básicos como aplicados. Se destaca su importancia como fijador de N₂ en el suelo, como productor de fitohormonas y por su capacidad de solubilizar fosfatos, pero al igual que *Azospirillum spp.*, siempre sujeto a condiciones ambientales (Rubio & Petricari, 2010).

2.3.4 Uso en Chile

En Chile, no se registra la producción de este tipo de bacterias, sin embargo, el producto TwinN contiene en su composición, bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.* liofilizadas. TwinN es el producto que se destaca por su mayor participación en el mercado de biofertilizantes en base a microorganismos, desde que se comenzó a importar en el año 2009 y como se señaló anteriormente, la tendencia indica, que su demanda ha ido creciendo y que el producto se ha popularizado rápidamente en poco tiempo.

No se tiene conocimiento de pruebas de campo realizadas en Chile con bacterias del género *Azospirillum* o *Azotobacter* como bioinoculantes, a parte de las realizadas con el producto TwinN. Las pruebas publicadas tanto por la empresa AMEcológica (distribuidor en Chile) como por Mapleton Agri Biotec (Fabricante), han sido principalmente en cultivos de arándanos, cerezas y duraznos orgánicos. Profesionales de la Universidad de Concepción, realizaron el año 2013, un estudio en cultivos de lupino, en donde probaron el reemplazo de la fertilización nitrogenada por TwinN en distintos grados, concluyendo que con solo una aplicación de TwinN, era posible a lo menos obtener resultados en materia seca estadísticamente iguales a los de una fertilización nitrogenada tradicional durante las primeras 8 semanas (Chiang, Gerding, Doussoulin, & Guajardo, 2013).

Además, se sabe que se concretó un convenio entre la Universidad de la Frontera y la empresa AM Ecological Chile para el estudio del efecto del biofertilizante TwinN en la producción y calidad de trigo. La publicación de este estudio fue desgraciadamente retirada de la página web de la empresa, por razones que se desconocen.

2.4 ANÁLISIS DE LA PROYECCIÓN EN EL CONSUMO DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS

Para cuantificar el consumo de *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.* utilizados con el objetivo de aumentar la fijación de nitrógeno en el suelo, se analizó el consumo de TwinN de acuerdo a las importaciones realizadas, ya que este producto, es el único que consiste sólo de bacterias fijadoras de nitrógeno y además es el producto de mayor importancia comercial en Chile actualmente, siendo el más representativo para realizar la proyección.

Se proyectó el consumo de TwinN, bajo un modelo potencial, pues éste presentó una relación favorable entre bondad de ajuste alta y un pronóstico en concordancia con la serie (ver Fig. 2.7).

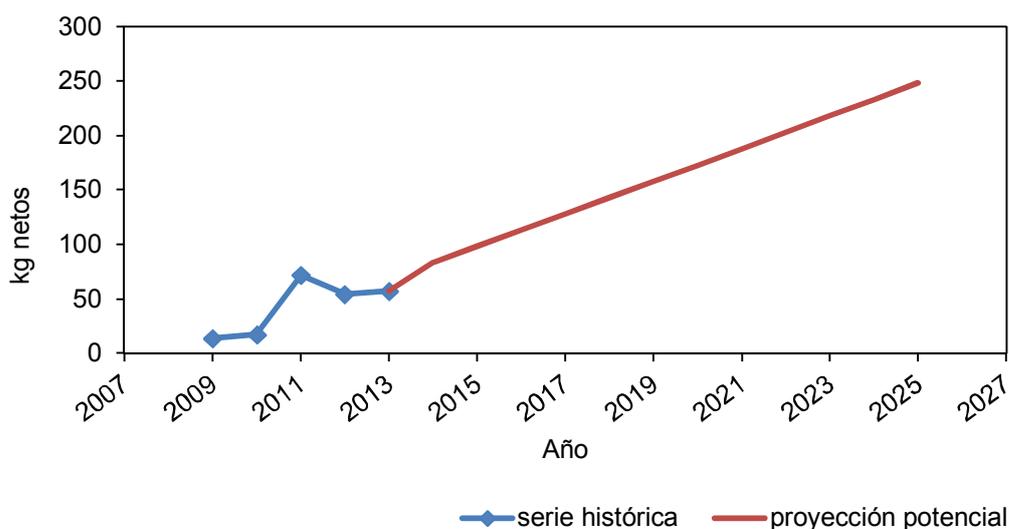


Fig. 2.7 Proyección del consumo de bacterias con acción biofertilizante, específicamente utilizadas en la fijación de nitrógeno (TwinN).

De acuerdo a la serie histórica, entre los años 2009 y 2013, la demanda aumentó en una tasa de crecimiento anual del 43%. De acuerdo a la proyección realizada, se espera que para el año 2024, se consuman alrededor de 235 kg de producto, lo cual equivale a una superficie de 146.000 ha cubiertas, considerando dos aplicaciones en una temporada y una tasa de crecimiento anual del 14% respecto del año 2013.

2.5 ANÁLISIS DE LA DEMANDA DE ACUERDO AL RUBRO DE APLICACIÓN AGROPECUARIA

Como ya se ha mencionado anteriormente, la aplicación de microorganismos a los cultivos no es un tema simple y depende de muchos factores. Así como existen microorganismos específicos para ciertos cultivos, como por ejemplo, los de asociación simbiótica (micorrizas o rhizobios), también existen microorganismos como *Azospirillum spp.* y *Azotobacter spp.*, que si bien se sabe que se asocian preferentemente a cereales, éstos no son específicos como se ha señalado en la sección 2.3.1, mejorando rendimientos de otros cultivos como, plantas forrajeras, tubérculos, cultivos industriales (maravilla, raps, tomate, etc) y algunos frutales. Con el objetivo de estimar la demanda potencial de los microorganismos seleccionados, se ha realizado una proyección de aquellos cultivos que potencialmente podrían ser inoculados y disminuir así el uso de fertilizantes químicos. La información acerca de las hectáreas cultivadas de los diferentes cultivos se obtuvo de la información entregada por la oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA).

El territorio con aptitud para cultivos, sin limitaciones, corresponde a poco más del 1% del territorio nacional, unas 760 mil hectáreas (Universidad de Chile, 2010). La capacidad de uso agrícola de las tierras en Chile se puede observar en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7 Capacidad de uso/aptitud agrícola de las tierras

Capacidad de Uso		Superficie (ha)	%
Suelos agrícolas arables	Cultivos sin limitaciones	764.164	1%
	Cultivos con limitaciones	3.869.178	5%
Subtotal arable		4.633.342	6%
Suelos agrícolas no arables	Ganadería	2.271.144	3%
	Ganadería-forestal	6.219.736	8%
	Forestal	13.430.602	18%
Subtotal no arable		21.921.482	29%
Total agrícola		26.554.824	35%
Suelos no agrícolas	Conservación y reservas de la naturaleza	14.200.000	19%

Capacidad de Uso	Superficie (ha)	%
Total productivo	40.754.824	54%
Improductivo	34.869.936	46%
Total territorio	75.624.760	100%

Fuente: (Universidad de Chile, 2010)

a) Cereales

Los cereales son los cultivos anuales más importantes en el país e incluyen trigo (trigo blanco y candeal), avena, cebada (cervecera y forrajera), centeno, maíz, arroz y triticales (Parada, Reyes, & Mera, 2007). La superficie cultivada con cereales es de aproximadamente 576 mil hectáreas (temporada 2012/13), de las cuales un 44% corresponde a trigo, un 24% a maíz y un 22% a avena. El 69% de las siembras de trigo y el 85% de las de avena se concentran en las regiones del Bío Bío y La Araucanía. El maíz se siembra principalmente en las regiones de O'Higgins y el Maule, que reúnen el 75% de la superficie (ODEPA, 2014 a). La serie histórica sembrada desde la temporada 2003/2004, permiten determinar la proyección del cultivo de cereales para la temporada 2024/2025 (ver Fig. 2.8)

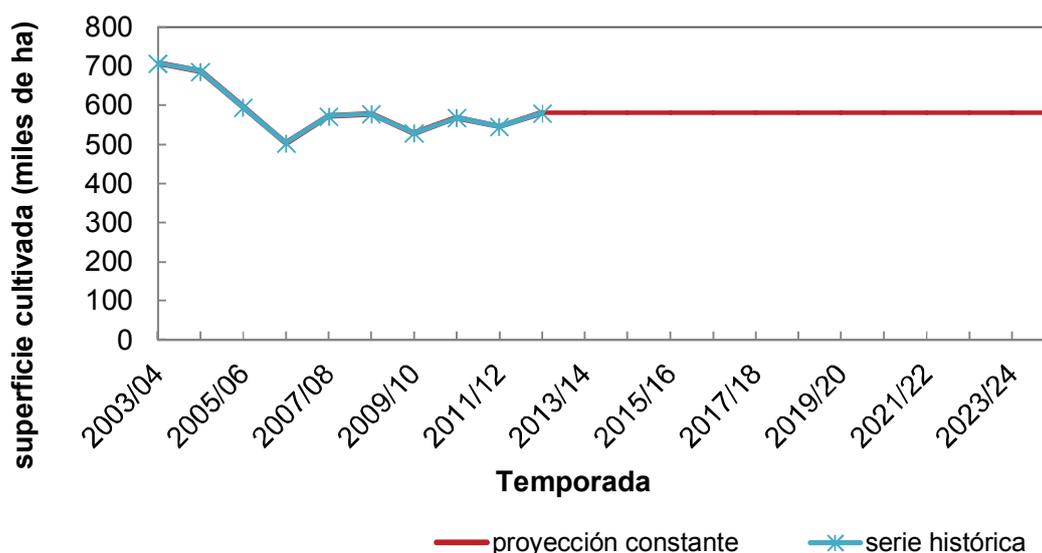


Fig. 2.8 Serie histórica y proyección de la superficie total de cereales cultivada por temporadas

De acuerdo a la serie histórica entregada por el INE, la superficie de cereales hace 40 años, era de casi 700 mil hectáreas, pero hoy con menos hectáreas sembradas, gracias a los incrementos en rendimiento y tecnología, se logra producir aproximadamente la mitad de lo que se demanda internamente hoy en día. A pesar de que Chile depende de las importaciones y no produce todos los cereales que se consumen, se vislumbra que los cultivos de cereales van a seguir relativamente constantes (Cotrisa S.A.; Sofo Temuco, 2014).

b) Industriales

La superficie cultivada con cultivos industriales es de aproximadamente 100 mil hectáreas, de las cuales un 42% corresponde a raps, un 20% a lupino y un 19% a remolacha. El 53% y el 27% de las siembras de raps se concentran en las regiones de La Araucanía y del Bío Bío, respectivamente. El 97% del lupino se siembra en la Región de La Araucanía y el 68% de la remolacha se cultiva en la Región del Bío Bío (ODEPA, 2014 b). De acuerdo a la serie histórica (ver Fig. 2.9), la proyección indica que el cultivo de industriales debiese aumentar, siendo el ajuste más acorde, la proyección lineal.

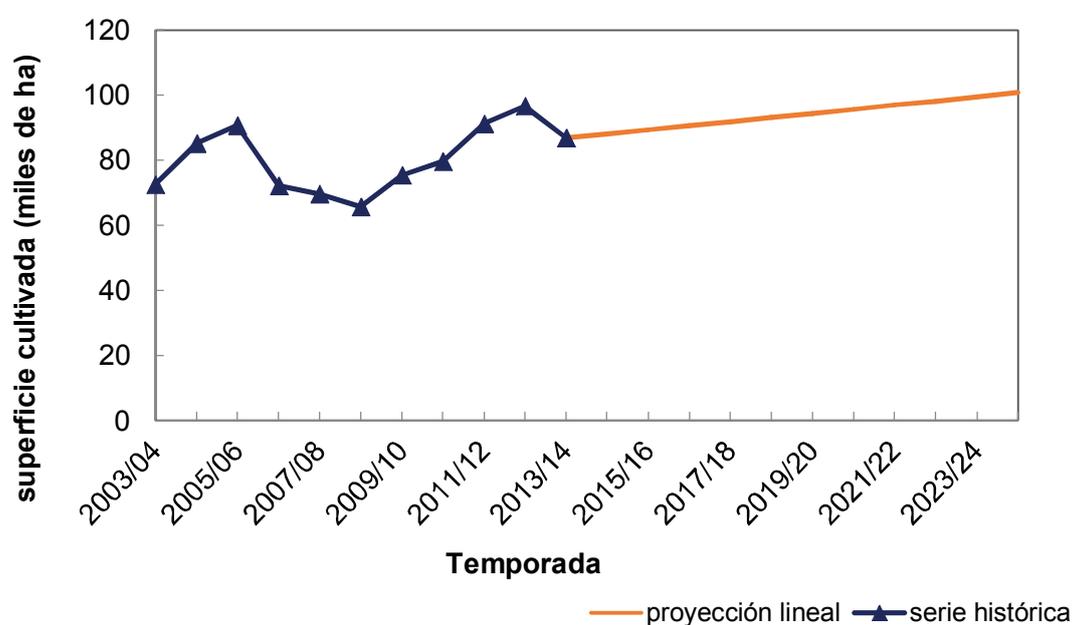


Fig. 2.9 Serie histórica y proyección de la superficie total de leguminosas y tubérculos cultivada por temporadas

c) Frutales

La superficie frutícola nacional alcanza 300 mil hectáreas, entre las regiones de Atacama y Los Lagos. El sector produce cerca de 5 millones de toneladas de fruta, de las cuales se exportan 2,6 millones como fruta fresca, generando más de USD 4 mil millones anualmente. Chile es el primer exportador frutícola del hemisferio sur y líder exportador mundial de uva de mesa y arándanos (ODEPA, 2014 c).

Los principales cultivos frutales en términos de superficie utilizada son la uva de mesa con un 18% de la superficie, los manzanos con un 13%, los paltos con un 12%, los ciruelos con un 6% y los duraznos con un 5%. El resto de los cultivos no ocupa más del 4% cada uno.

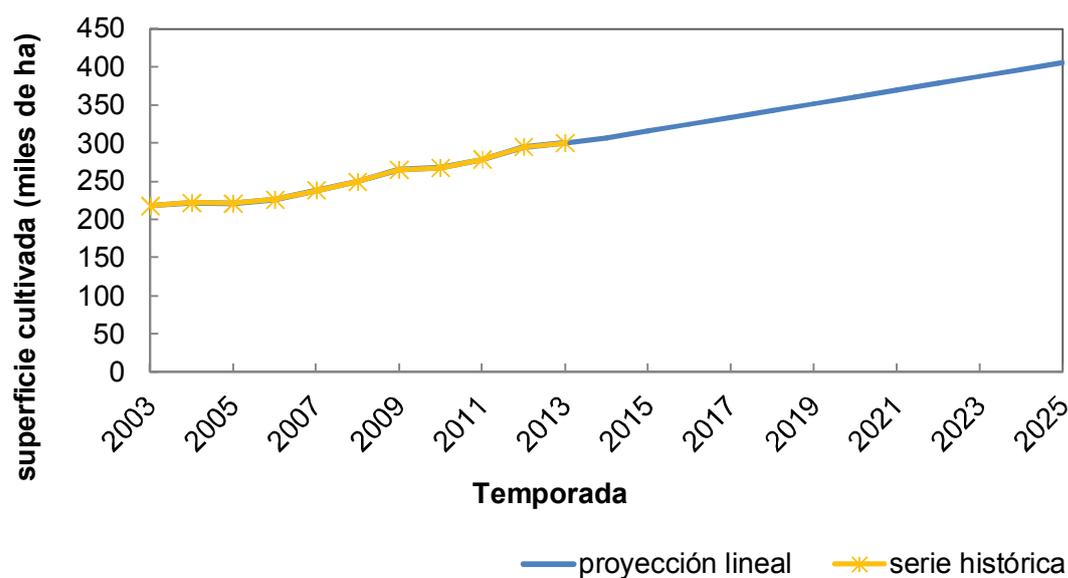


Fig. 2.10 Serie histórica y proyección de la superficie total de frutales cultivada por temporadas

De acuerdo a la serie histórica representada en la Fig. 2.10, se espera que la actividad frutícola aumente con el tiempo, siendo la proyección lineal la más representativa de acuerdo a lo esperado.

d) Hortalizas

El sector hortícola tiene gran importancia para el país: se encuentra en todas regiones con cerca de 34 mil explotaciones de acuerdo al último censo agropecuario (2007), e incluyendo las huertas caseras llegan a ser más de 96 mil, lo que significa aproximadamente que casi un tercio de todas las explotaciones silvoagropecuarias del país contienen cultivos hortícolas.

De acuerdo a las estimaciones del INE, la superficie hortícola nacional alcanzó casi 81 mil hectáreas el año 2013 y el 85% se encuentra entre las regiones de Coquimbo y del Maule. Las hortalizas con mayor superficie cultivada son el choclo y la lechuga, con participaciones de 15% y 8%, respectivamente (ODEPA, 2014 d). Es importante destacar, que hay hortalizas que se siembran más de una vez al año en la misma superficie, por lo que para efectos de la fertilización, este factor debe ser considerado. Para obtener la proyección de la superficie cultivada con hortalizas, se multiplicaron los cultivos por la cantidad de veces que se siembran al año, obteniéndose una superficie total cultivada de 110 mil hectáreas la temporada 2009 y 90 mil quinientas hectáreas, la temporada 2013. Según la tendencia que se obtiene de la serie histórica, la superficie de hortalizas ha disminuido levemente. Esto se debe a tres principales causas: la primera, es que han aumentado los rendimientos, la segunda es la escasa mano de obra y la tercera es debido al efecto que ha provocado la sequía los últimos años (Ramm, 2014). De acuerdo a esto, es difícil estimar cómo será el comportamiento de las hortalizas para el año 2014, por lo que se considera apropiado asumir una proyección potencial, la cual indica una disminución en la superficie cultivada de forma poco significativa (ver Fig. 2.11).

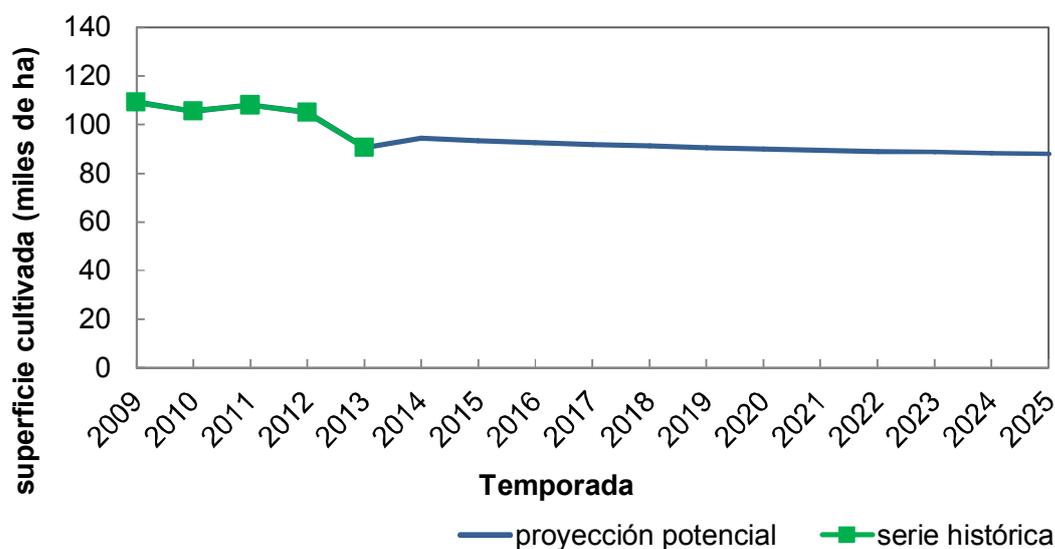


Fig. 2.11 Serie histórica y proyección de la superficie total de hortalizas cultivada por temporada

2.6 CAPACIDAD DE LA PLANTA

Dado los índices de consumo y la demanda potencial de productos bioinoculantes en base a bacterias fijadoras de nitrógeno, se tiene que el producto TwinN, la temporada 2012/2013 tuvo un porcentaje total de cobertura del orden del 3% (ver Tabla 2.9) respecto de la superficie total cultivada señalada en la Tabla 2.8, y de acuerdo a la tendencia del consumo histórico, para la temporada 2024/2025 se espera que el porcentaje de cobertura aumente al 12%.

Tabla 2.8 Resumen superficie cultivada con posibilidad de inoculación

Cultivo	superficie cultivada (ha)		
	2012/2013	2014/2015	2024/2025
Cereales	580.678	580.677	580.678
Industriales	96.557	88.063	100.693
Hortalizas	90.486	93.353	87.805
Frutales	300.061	315.425	405.059

Cultivo	superficie cultivada (ha)		
Total	1.067.782	1.077.518	1.174.235

Tabla 2.9 Porcentaje de hectáreas cubiertas (o a cubrir) por TwinN

año de importación	2012	2014	2024
TwinN disponible* (ha)	33.967	52.295	145.833
Cobertura TwinN (%)	3%	5%	12%

*Cantidad de producto importado representado en cantidad de hectáreas a cubrir.

De acuerdo a este escenario y considerando que, con los productos actualmente disponibles, más de un 90% del mercado no está siendo cubierto, se propone cubrir un 14% de la superficie total de los cultivos a inocular en la temporada 2014/2015, y un 20% en la temporada 2024/2025, lo cual corresponde a 150 mil y 235 mil hectáreas respectivamente.

Considerando que 1 hectárea debe ser inoculada con 10^{11} UFC (Bashan Y. , 1998), el año 2024 se deben producir aproximadamente $5 \cdot 10^{16}$ UFC, lo que se traduce en un volumen anual de cultivo de aproximadamente 13.000 [L] y 82 [kg biomasa]. Dado que en las diferentes etapas del proceso hay pérdida de viabilidad celular, se obtiene un rendimiento global de un 35% (ver sección 4.9) para lo cual se deben producir aproximadamente 235 [kg biomasa/año], lo que equivale a 5.364 kg de producto final encapsulado.

2.7 UBICACIÓN DE LA PLANTA

La ubicación de la planta debe ser tal que se logre una máxima rentabilidad del proyecto, lo que puede estar basado en minimizar los costos unitarios, un mejor acceso a los mercados proveedores y consumidores, aspectos legales, ambientes y disponibilidad de materias primas y a fuentes de energía. Para un proyecto de esta envergadura se considera que los aspectos más relevantes al momento de elegir la ubicación de la planta son:

- Cercanía a mercador consumidor.

- Disponibilidad a fuentes de energía.
- Disponibilidad de agua
- Proveedores

Se debe tener en cuenta que para este proyecto uno de los factores más importantes es la cercanía a los potenciales clientes, ya que al contar con una empresa nueva es necesario hacerla conocida en el mercado, lo que se puede lograr de mejor manera estando en las cercanías de los agricultores. De esta forma se podrían hacer convenios con distintas empresas del rubro agrícola, pudiéndose hacer estudios en conjuntos que involucren mejoras tanto en los cultivos como en el producto.

La agricultura nacional se desarrolla principalmente en el extremo sur del país, pero las regiones con mayor porcentaje de cobertura son la VII, VIII y IX (Instituto Nacional de Estadísticas (INE), 2013).

Tabla 2.10 Porcentaje de participación por región respecto a hectáreas cultivadas año 2012/2013

VII	VIII	IX
16,28%	22,44%	35,82%

Otro factor significativo es la disponibilidad de agua en el sector, ya que al tratarse de un proceso de fermentación el recurso agua es muy importante. Según se muestra en la Fig. 2.12 la disponibilidad de oferta de agua vs demanda en algunas regiones es crítico, por lo que es necesario considerar aquellas donde la proporción de oferta sea mayor a la demanda.

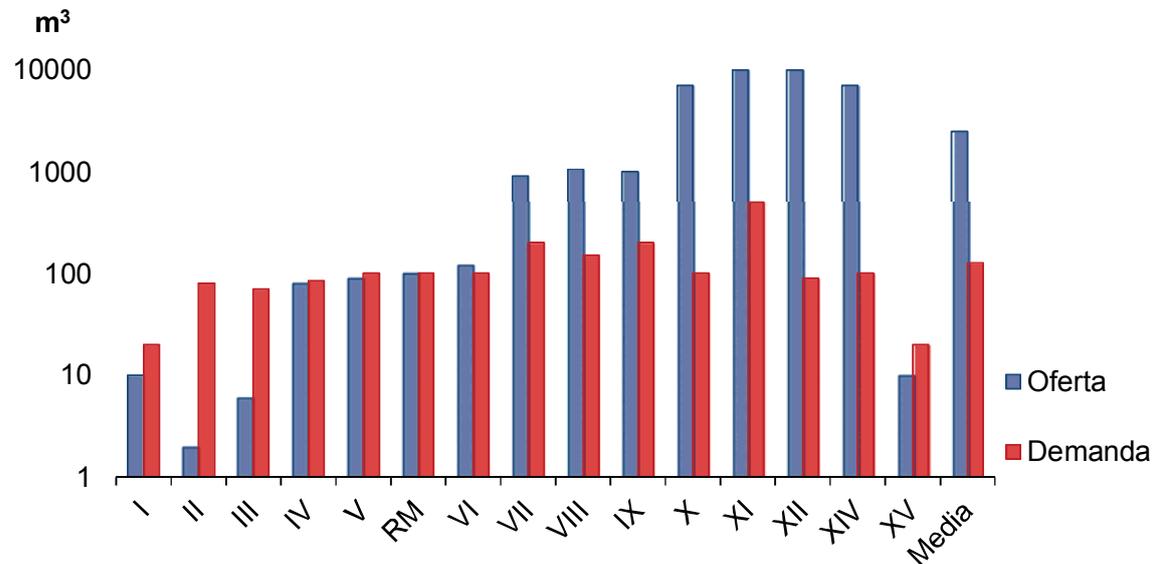


Fig. 2.12 Oferta y Demanda de recursos hídricos según región
Fuente: (Ministerio de obras Públicas (MOP), 2012)

De esta manera, pueden ser consideradas las regiones comprendidas entre las VII y XII, ya que el volumen de agua por habitante al año disponible, es mayor al demandado.

Considerando entonces que las regiones con mayor actividad agrícola son la VII, VIII y IX y las con mayor disponibilidad del recurso agua son entre las VII y XII región, se decide instalar la planta productora de microorganismos destinados a su uso en agricultura en la región del Bio Bio.

CAPÍTULO 3

SÍNTESIS Y SELECCIÓN DE PROCESOS

Como en todo tipo de proceso, el diseño es parte fundamental del desarrollo del mismo, así como también la elección de las operaciones y tipos de equipos a utilizar, de modo que posteriormente se puedan realizar los balances de masa y energía correspondientes. De acuerdo a los objetivos y a la información planteada en los capítulos anteriores, en esta sección se establecerán los procesos y criterios para la producción de bacterias del género *Azospirillum* y *Azotobacter*, así como también los requerimientos nutricionales y condiciones de fermentación para llevar a cabo el proceso; por último se describirá el proceso consecutivo a la fermentación que consta de la formulación del producto como tal.

Dado que se quiere crear un producto efectivo y de alto impacto en el mercado, es necesario que éste cuente con procesos actuales y vigentes, así como con tecnologías vanguardistas de manera de obtener algún valor agregado que permita hacer más competitivo el producto en el mercado. Es por eso que la etapa de formulación será primordial en lo que refiere a la selección de la presentación del biofertilizante.

3.1 MEDIO DE CULTIVO

A continuación se analizarán las distintas posibilidades de medios de cultivos para cada microorganismo, analizando las fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, soluciones nutritivas, sales y factores fisicoquímicos. La elección se basará en el diseño que presente una mejor tasa de crecimiento, relacionado con una alta concentración de biomasa conforme a los costos asociados a los componentes del medio.

3.1.1 Requerimientos nutricionales

Las especies de *Azospirillum* spp., difieren en su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno (Tabla 3.1). Estas bacterias usan para su crecimiento

unos pocos monosacáridos y disacáridos así como alcoholes polihidroxiados, y principalmente diversos ácidos orgánicos tales como málico y succínico y algunos aminoácidos (Burriss, Fu, & Hartmann, 1988). Para el uso de diferentes fuentes de carbono, tanto *A. lipoferum* como *A. brasilense* tienen todas las enzimas de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y de la vía de Entner-Doudoroff (Cutshall, Vigil, & Westby, 1983), así como todas las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Burriss, Burpee, Del Gallo, & Martinez-Drets, 1984). Este género tiene un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil, lo que le permite adaptarse y establecerse en el competitivo entorno rizosférico, pudiendo utilizar un amplio rango de sustratos. En condiciones desfavorables, tales como desecación y carencia de nutrientes, puede enquistarse, recubriéndose de una capa de polisacáridos produciendo una acumulación de gránulos de β -hidroxibutirato, que sirven a la bacteria de reserva de fuente carbonada (de Bashan, Holguin, Glick, & Bashan, 2007).

Tabla 3.1 Utilización de fuente de carbono disponible para distintas especies de *Azospirillum*

Especies	<i>A. doebereineriae</i>	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. halopraeferens</i>	<i>A. amazonense</i>
Fuentes de Carbono					
N-acetil glucosamina	-	+	-	ND	d
Glucosa	d	+	-	-	+
Glicerol	+	+	+	+	-
Manitol	+	+	-	+	-
Ribosa	-	+	-	+	+
Sorbitol	+	+	-	-	-
Sacarosa	-	+	+	-	+

*-, presente en 10% o menos de las cepas; +, presente en 90% o más de las cepas; d, 11-89% de todas las cepas positivas; ND, no definido

El género *Azotobacter* es muy parecido al género *Azospirillum*, ya sea en su funcionamiento, como en morfología y requerimientos nutricionales y ambientales. Como ya se mencionó ambas son bacterias diazotróficas y tienen la capacidad de metabolizar una amplia gama de sustratos para fuente de carbono. *A. vinelandii* puede metabolizar diferentes fuentes de carbono, tales como sacarosa, glucosa, fructosa, manosa, sorbitol, glicerol, gluconato, acetato (Dawes, Horan, & Jarman, 1981) (Tabla 3.2). Al igual que cepas del género *Azospirillum*, *Azotobacter* posee las enzimas de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y de Entner-Doudoroff

(Cutshall, Vigil, & Westby, 1983), así como todas las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Burris, Burpee, Del Gallo, & Martínez-Drets, 1984). Bajo determinadas condiciones nutricionales y ambientales, esta bacteria produce el poliéster intracelular poli- β -hidroxibutirato (PHB), el polisacárido extracelular alginato y compuestos sideróforos (Díaz-Barrera & Soto, 2010).

Tabla 3.2 Utilización de fuente de carbono disponible para distintas especies de *Azotobacter*

Especies	<i>A. vinelandii</i>	<i>A. beijerinckii</i>	<i>A. paspali</i>	<i>A. chroococcum</i>
Fuentes de Carbono				
Fructosa	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+
Glicerol	+	d	-	d
Manitol	+	d	-	+
Sorbitol	+	d	-	+
Sacarosa	+	+	+	+

*-, presente en 10% o menos de las cepas; +, presente en 90% o más de las cepas; d, 11-89% de todas las cepas positivas

A continuación se describirán las fuentes de nutrientes y energía que necesitan las bacterias del género *Azospirillum* y *Azotobacter* para su correcto funcionamiento y metabolismo.

a) Fuente de carbono

Azospirillum spp.

La fuente de carbono es uno de los principales factores en la fermentación de cepas de *Azospirillum*. Fuentes como glucosa, sacarosa, alcoholes y algunos ácidos orgánicos son posiblemente metabolizables por la bacteria. La glucosa puede ser utilizada por *A. lipoferum*, sin embargo este monosacárido no puede ser metabolizado por *A. brasilense* como única fuente de carbono en crecimiento dependiente de N₂. Ambas especies crecen bien en medios con ácidos orgánicos como el málico, succinato, láctico y pirúvico. Sin embargo el crecimiento empleando hidratos de carbonos es más restringido, ya que *A. brasilense* es particularmente exigente en sus necesidades de carbono, no creciendo en D-glucosa, D-manosa ni D-sorbosa, pero si en D-fructosa, D-galactosa y L-arabinosa. (Burris, Burpee, Del Gallo, & Martínez-Drets,

1984). *A. lipoferum* es menos restrictivo en el uso de fuentes de carbono, puede crecer en los mismos ácidos orgánicos y carbohidratos que *A. brasilense*, además de glucosa, manosa, sorbosa y α -cetoglutarato.

Cuando *Azospirillum* agota sus fuentes de carbono exógeno y se encuentra bajo condiciones de stress nutricional, comienza a formar estos agregados celulares más conocidos como quiste. Este proceso de supervivencia permite que el microorganismo acumule gránulos de PHB de forma endógena, los cuales son empleados por la propia célula como fuente de carbono y energía. (Albrecht, Burris, & Okon, 1976)

Azotobacter spp.

Bacterias quimio heterótrofas que como fuente de carbono y energía utiliza una gran variedad de ácidos orgánicos, azúcares o sus derivados alcohólicos como el manitol, que es el sustrato más empelado para aislar y cultivar bacterias de este género. Dentro de las sustancias que usan como fuente de carbono y energía se encuentra la fructosa, glucosa, sacarosa, acetato, fumarato, piruvato succinato, acetilmetilcarnil y α -cetoglutarato (Bergey & Breed, 1957). *A. chroococcum* es capaz de metabolizar una serie de compuestos fenólicos como ácidos p-hidroxibenzóico, vanílico, p-cumárico, ferulico y 4-hidroxifenilacético. *A. vinelandii* es capaz de degradar fácilmente sustratos como glucosa y sacarosa.

Al igual que el género *Azospirillum*, *Azotobacter* tiene la capacidad de formar estructuras resistentes frente a situaciones de stress, llamados quistes. Además tiene la característica de no solo sintetizar phb sino también polímeros de alginato.

b) Fuente de Nitrógeno

Como fuentes nitrogenadas, *Azospirillum spp.* y *Azotobacter spp.*, puede utilizar un amplio rango de sustratos como: amonio, nitrato, nitrito y aminoácidos. Cuando existe una baja concentración de la fuente de nitrógeno, se expresa la actividad nitrogenasa, pudiendo así captar la bacteria el nitrógeno molecular atmosférico. Estas bacterias diazotróficas necesitan nitrógeno para la biosíntesis de sus proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular.

Los aminoácidos más utilizados son de la serie D, como D-alanina, D-aspártico e histidina, el cual es microorganismo no es capaz de sintetizarlo por sí solo (Burriss, Fu, & Hartmann, 1988).

c) Fuente de P y S

El fósforo es considerado como un elemento esencial para el desarrollo de *Azospirillum spp* y *Azotobacter spp.*, tanto en el suelo como en el medio de cultivo, puesto que estimula el metabolismo del carbono y fijación de nitrógeno. La falta de este micronutriente puede llegar a inhibir el desarrollo del microorganismo o su potencial producción de PHB (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). El fósforo es agregado al medio de cultivo en forma de ácidos nucleicos y fosfatos (PO_4^{-3}).

El azufre es asimilado por el microorganismo para la síntesis de aminoácidos azufrados como metionina y cisteína. Este no metal suele ser adicionado al medio de cultivo en forma de sulfato (SO_4^{-2}), siendo el más común MgSO_4 y K_2SO_4 .

d) Fuente de Mg y K

Ambos elementos son necesarios para que estas bacterias lleven a cabo la fijación diazotrófica de nitrógeno. Gran parte del potasio está unido al RNA, de manera que el requerimiento de K aumenta con los factores cinéticos como la velocidad de crecimiento.

Mg es esencial para la estabilidad de los ribosomas y dentro de la célula actúa como cofactor en distintas reacciones metabólicas. Como se puede ver en la fuente de F y S, tanto Mg y L pueden ser incorporado por medio de fosfatos y sulfatos (Rivera, 2008). La cantidad de potasio es generalmente muy pequeña, ya que puede llegar a inhibir el desarrollo de las bacterias fijadoras de nitrógeno.

e) Micronutrientes

La necesidad de estos microelementos no es algo trivial, ya que varios de ellos contribuyen al funcionamiento estructural de muchas enzimas. Se puede diferenciar entre dos categorías de micronutrientes: una compuesta por aquellos que son utilizados para el crecimiento como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn y los que son raramente esenciales para el metabolismo, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, Se, As, Mo, Sn, I. Generalmente es difícil demostrar el requerimiento exacto de un micronutriente, ya que la mayoría de las veces ellos se encuentran en forma de impurezas de los componentes principales (Rivera, 2008).

f) Vitaminas

Muchas vitaminas o sus derivados actúan como coenzimas; la mayoría de los organismos son capaces de sintetizar todos los componentes de sus coenzimas, pero algunos no pueden y requieren de la adición de ciertas vitaminas al medio, ya que, como se mencionó, actúan como coenzimas. Las vitaminas de la familia B son generalmente aquellas más requeridas. Se debe tener en cuenta que las bacterias del género *Azospirillum* poseen la capacidad de producir este tipo de vitaminas, por lo que el aplicarlas artificialmente al medio de cultivo, resulta en una alteración al crecimiento microbiano (Dahm, 1993)

3.1.2 Factores fisicoquímicos

a) pH

Azospirillum spp.

Presenta un rango óptimo de pH entre 6,5-7,0. Si el pH excede o es menor a ese valor, se podrían desencadenar una serie de reacciones que provocarían la inhibición del crecimiento y desarrollo del microorganismo. Para *A. brasilense*: pH 6,0-7,8; *A. lipoferum*: pH 5,7-6,8; *A. amazonense*: pH 5,7-6,5; *A. halopraeferens*: pH 6,0-8,0; *A. doebereineriae*: pH 6,0-7,0.

Azotobacter spp.

Se ha reportado que especies de *Azotobacter* pueden crecer desde pH alrededor de 5,5, como *A. chroococcum* y *A. vinelandii* (Saribay, 2003), sin embargo el rango óptimo para el crecimiento cuando realizan fijación de nitrógeno se encuentra entre 7,0-7,5. (Balandreau, 1986). Cabe destacar que el pH de la fermentación disminuye con el consumo de la fuente de carbono.

b) Temperatura

Azospirillum spp.

La mayoría de las especies del género *Azospirillum* requieren una temperatura entre los 30-37°C para un óptimo crecimiento. *A. largimobile* y *A. halopraeferens* son la excepción, necesitando una temperatura óptima de 28 °C y 41°C respectivamente.

Azotobacter spp.

Se establece que una temperatura entre 30-32°C es favorable para el crecimiento del género *Azotobacter*, siendo la temperatura óptima alrededor de 30°C (Balandreau, 1986). La temperatura característica de *Azotobacter vinelandii* se encuentra en el rango de 20-30°C pero su rango límite de supervivencia abarca entre los 10-50°C y su temperatura óptima de crecimiento es de 34-35°C (Burk, Horner, & Lineweaver, 1932).

c) Aireación

Los requerimientos de oxígeno por parte del género *Azospirillum* son bastante limitante, cuando los niveles de oxígeno son altos, las células son capaces de crecer y multiplicarse satisfactoriamente, mientras que a altas concentraciones de oxígeno, se impide que se lleve a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno mediante la expresión de la enzima nitrogenasa (Barak, Henis, Nur, & Okon, 1982). La mayoría de los estudios recalcan el uso de medios de cultivo con ausencia de fuente de nitrógeno para mejorar las capacidades fijadoras de la cepa estimulando la producción de la enzima nitrogenasa.

Existen diversas fuentes que respaldan valores de aireación para cultivos de *Azospirillum spp* y *Azotobacter spp*. Según (Rivera, 2008) para mantener una adecuada multiplicación de este microorganismo se debe tener en cuenta una relación 1/5 - 2/5 de oxígeno, para el medio Dygs se provee una aireación de 3/5 de relación de oxígeno al igual que en un medio optimizado para *A. brasilense* (Bonilla, Obando, & Rivera, 2012). En un cultivo utilizado para la producción de un fertilizante a base de *Azotobacter spp* y *Azospirillum spp*. se emplea una aireación entre 1,5-3 vvm (España Patente nº 2093559, 1997). Para un ensayo con *A. vinelandii* se obtuvo que el flujo óptimo para el cultivo de este microorganismo es de 1 L/min (0,25 vvm).

3.1.3 Medio de cultivo para *Azospirillum spp* y *Azotobacter spp*.

A continuación se presentan distintos medios de cultivo de acuerdo a los requerimientos nutricionales mencionados en el capítulo 3.1.1. Se debe tener en cuenta que estos medios no son los únicos utilizados para el cultivo de estos microorganismos, existen medios optimizados en donde las bacterias alcanzan tasas de crecimiento mucho mayor; debido a que solo se requiere un aumento de la biomasa sin ningún otro particular, se descartan aquellos medios optimizados definidos, ya que la relación de costo productividad no es relevante para el caso.

a) Medio Dygs

Este medio de cultivo se utiliza para la multiplicación de bacterias pertenecientes al género *Azospirillum spp*. Presenta inconvenientes a la hora de utilizarlo para un proceso de producción a escala piloto o industrial, debido a la baja tasa de producción de biomasa del microorganismo y dificultades de contaminación en el manejo de este, por ser un medio muy enriquecido lo que favorece el crecimiento de un amplio rango de microorganismos con diferentes metabolismos.

Los procesos de obtención y/o estandarización del inóculo, suelen realizarse con este medio, siendo las condiciones de incubación a 30 ± 2 °C y 120 rpm ajustándose el pH a 6,8 con una solución de KOH al 10% o con solución H₂SO₄ al 5%. La composición del medio se describe en la Tabla 3.3.

Para el cultivo de *A. brasilense* utilizando este medio se han alcanzado valores de $\mu=0,22 \text{ h}^{-1}$ (Rivera, 2008).

Tabla 3.3 Medio Dygs

Componentes	Cantidad [g/L]
Glucosa	2
Peptona	1,5
Extracto de levadura	2
Ác. Glutámico	1,5
Ác. Málico	2
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	0,5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5
pH final ajustado para 6,8	

Fuente: (Malavolta, Rodrigues, & Victor, 1986)

d) Medio Luria Bertani (LB)

El medio Luria Bertani, o también llamado Caldo de Lisogenia, es un medio nutricionalmente rico que se utiliza principalmente para el crecimiento de bacterias. En general este medio también es utilizado para condiciones de laboratorios, debido a su alto costo.

Tabla 3.4 Medio Luria Bertani

Componentes	Cantidad [g/L]
Extracto de levadura	5
Triptona	10
NaCl	5
pH final ajustado a 7	

Fuente: (DIBICO S.A. DE C.V. MEXICO, D.F. , 2014)

e) Nfb

Este caldo de cultivo es selectivo para aislar bacterias fijadoras de nitrógeno, ya que como su nombre lo dice (nitrogen fixation bacteria) promueve la acción de la enzima nitrogenasa sobre

el nitrógeno atmosférico. Es por eso que este medio carece de fuente de nitrógeno y como fuente de carbono utiliza malato.

Tabla 3.5 Medio Nfb

Componentes	Cantidad [g/L]
Ác. Málico	3
Glucosa	2
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,02
Sol. micronutrientes	2 ml
Azul de bromotimol en KOH 0,2 N	sol. 0,5% 2 ml
Fe-EDTA sol 1,64%	4 ml
KOH	4,5 ml
Sol. vitamínica	1 ml

Fuente: (Bergey D. H., 1984)

La solución de micronutrientes contiene: 0,2 g/L Na₂Mo₄*2H₂O; 0,235 g/L MnSO₄; 0,28 g/L H₃BO₃; 0,008g/L CuSO₄*5H₂O; 0,024 g/L ZnSO₄*7H₂O; 4 ml (1,64%) EDTA-Fe, nutrientes que son fundamentales para estos microorganismos, como se explica en la sección 3.1.1.

Mientras este medio se adecua muy bien a escala laboratorio, no es apto para escala piloto ni industrial, debido a su baja tasa de producción (Bashan, Trejo, & E. de-Bashan, 2011).

f) Burk

El medio Burk es un medio definido el cual contiene sacarosa como fuente de carbono, y es ampliamente utilizado para bacterias fijadoras de nitrógeno, no solo a nivel de laboratorio sino también a escala industrial. Pruebas con cepas de *Azotobacter spp.* indican que se pueden llegar a lograr concentraciones de hasta 4 g/L de biomasa a partir de un medio Burk modificado con una concentración de sacarosa de 16 g/L para. Esto se resume en un rendimiento del 25% de microorganismo cultivado.

Tabla 3.6 Medio Burk

Componentes	Cantidad [g/L]
Sacarosa	20
K ₂ HPO ₄	0,66
KH ₂ PO ₄	0,16
CaSO ₄	0,05
NaCl	0,2
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
NaMoO ₄ *2H ₂ O	0,0029
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,027
MOPS	1,42

Para cultivo de *Azotobacter vinelandii* se ha alcanzado $\mu=0,11 \text{ h}^{-1}$ a una velocidad de agitación de 200 rpm en cultivo de matraces (Peña, Galindo, & Büchs, 2011).

Selección del medio de cultivo

De acuerdo a los medios propuestos, se decide elegir como base el medio Burk, debido a su tasa de crecimiento y bajo costo, de aproximadamente 4.600 CLP/L (Himedia, 2014); se modificara en cuanto a su composición, siendo agregados 3 g/L de extracto de levadura, ya que se han reportado tasas de crecimiento un tanto mejor y debido al contenido de vitaminas y factores de crecimiento.

3.2 PRETRATAMIENTO

a) Pretratamiento del medio de cultivo

Como medio de cultivo se utilizara el Medio Burk modificado con la siguiente composición.

Tabla 3.7 Medio Burk modificado

Componentes	Cantidad [g/L]
Sacarosa	20
Extracto de levadura	3
K ₂ HPO ₄	1,32
KH ₂ PO ₄	0,32
CaSO ₄	0,05
NaCl	0,2
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
NaMoO ₄ *2H ₂ O	0,0029
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,027
MOPS	1,42

La preparación del medio consta de la elaboración de 3 soluciones; la primera contiene la sacarosa, extracto de levadura, sales de potasio y solución MOPS, los cuales son disueltos en 900 ml de agua destilada, y posterior ajuste de pH a 7,2 con NaOH 2N. A su vez, se disuelve el sulfato de calcio en 50 ml y se prepara otra solución con las sales restantes en un volumen de 50 ml. Con el objeto de evitar precipitaciones, las fracciones se esterilizan por separado a 121°C durante 20 min, y ya estériles se mezclan bajo campana (Peña, Campos, & Galindo, 1997). De esta manera se obtiene 1 L de medio Burk modificado. Esta metodología se utiliza para realizar los volúmenes de la etapa de propagación en matraz y para el primer reactor. Para realizar el medio de cultivo sólido, al medio de la Tabla 3.7 se le agrega agar tal que la concentración sea de 18g/L de manera de lograr una solución apta para crecimiento de microorganismos en medio sólido (placa de Petri). Estas capsulas de Petri con medio sólido sirven para ir renovando la biomasa inicial y no tener que necesariamente comprar placas de cultivo una vez acabada estas.

b) Pretratamiento del inoculo

Debido a que el proceso consta básicamente en la fermentación y posterior formulación de un inoculante a base de microorganismos, es necesario poseer un banco de células del cual se puedan disponer de estos microorganismos cada vez que se comience con la línea de producción. Para esto será necesario disponer de un banco celular maestro con cepas de *A.*

brasiliense y *A. vinelandii* de manera de asegurar la continuidad casi infinita del cultivo original del trabajo.

Utilizando el medio de cultivo seleccionado en la sección de selección de medio de cultivo se siembran las estirpes de *Azotobacter vinelandii* y de *Azospirillum brasiliense* en el medio sólido Burk modificado en placas Petri y se incuban a 30°C cada cultivo durante un periodo de tiempo de 72 horas.

Estos cultivos puros y de reciente crecimiento sirven para inocular matraces de 300 ml de capacidad con medio de cultivo, que se incuban a una temperatura comprendida entre 30±2°C a 170 rpm en una incubadora con agitación orbital (España Patente nº 2093559, 1997). Estos cultivos son considerados como pre inóculos para el inóculo del fermentador.

3.3 FERMENTACIÓN

La fermentación tiene como objetivo aumentar la biomasa inicial a tal concentración, de manera que posteriormente al formular la preparación de inoculante se logre un producto con las características deseadas.

a) Tipos de fermentación

Cultivo por lote

Una fermentación discontinua puede ser considerada como un "sistema cerrado". Al inicio de la operación se añade el medio de cultivo y el inóculo, incubando bajo las óptimas condiciones. A lo largo de toda la fermentación no se añade ni sustrato ni células, salvo corriente de gases, agentes antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células, observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. Estos cultivos son de gran uso cuando se quiere llevar a cabo una fermentación simple, por ejemplo

donde lo que se busque sea el aumento de biomasa o cuando una fermentación es inhibida por la concentración de sustrato.

Cultivo por lote alimentado (CLA)

La modalidad de cultivo por lote alimentado es considerada una modalidad de fermentación discontinua. Es un proceso tipo batch, el cual es alimentado constantemente con un flujo de nutrientes, lo que provoca una continua variación del volumen del fermentador. En una primera operación se lleva cabo el proceso batch indicado en el punto anterior, una vez alcanzadas estas condiciones se inicia la alimentación de nutrientes. Este tipo de cultivo es favorable cuando se quiere producir metabolitos mediante organismos recombinantes, producción de proteínas y antibióticos.

Cultivo continuo

El cultivo continuo se caracteriza por tener la flexibilidad de elegir a voluntad la velocidad específica de crecimiento del microorganismo, manteniendo la población en un estado fisiológico definido, contante y seleccionable. Este tipo de fermentación es más productiva que el cultivo por lote, y es utilizada cuando se requiere un producto de calidad constante. Como desventaja presenta un incompleto aprovechamiento de sustrato, mayor riesgo de contaminación y mutaciones debido a los prolongados tiempos de residencia de los microorganismos en el cultivo.

Como su nombre lo dice, existe una continua nutrición tanto de sustrato como de células, por lo que luego de una puesta en marcha, se logra un estado estacionario en el cual la concentración del reactor y del flujo de salida es constante.

b) Selección del tipo de fermentación

De acuerdo a los criterios planteados en la sección anterior, se decide utilizar el cultivo por lote discontinuo ya que satisface las condiciones de operación que se deben utilizar y las necesidades para aumentar la biomasa.

La fermentación se llevara a cabo en un reactor de tanque agitado mediante una operación batch discontinua. Se inoculara al 1% en volumen de medio; las condiciones de operación presentada en la Tabla 3.8 son a condiciones de laboratorio, por lo que cuando se estime la capacidad de los reactores se escala de acuerdo a estos parámetros.

Tabla 3.8 Condiciones de cultivo para escala laboratorio

Parámetro	Selección
Fuente de Carbono	Sacarosa
Condiciones de N ₂	Fijando N ₂ atmosférico
Agitación [rpm]	170-180
pH	7
T [°C]	30 ±2
Aireación [vvm]	1
Tiempo de cultivo [h]	72

Fuente: (Peña, Trujillo-Roldán, & Galindo, 2000)

La patente (España Patente nº 2093559, 1997) revela que para un proceso de obtención de fertilizante bacteriano a base de *A. brasilense* y *A. vinelandii* en una fermentación con medio Burk (fuente de carbono sacarosa 16 g/L) se ha alcanzado un rendimiento del 25% para ambas cepas. De acuerdo a este valor con un medio como el ya descrito, luego de 52 horas de cultivo se puede alcanzar una concentración de 4 g/L de biomasa (España Patente nº 2093559, 1997), para un $\mu_{\max} = 0,11 \text{ h}^{-1}$.

El proceso de fermentación se lleva a cabo en 2 etapas: la primera es la etapa de propagación en matraces de 0,3L y luego en fermentadores de 3L y 30L de capacidad. La segunda etapa consta de la fermentación principal realizada en un reactor de capacidad de 300L.

De acuerdo a lo estimado en la sección de capacidad de la planta, es que se decide operar por 2 líneas, una para cada microorganismo, la línea L1 y L1', donde cada

$$F_i = F_i'$$

Ecc. 3.1

De esta manera se determinan que la cantidad de lotes a realizar al año es de 147 en total, es decir de 87 lotes por línea productiva. Esto debido a que se considera que la eficiencia global del proceso completo es de 34,7%. De esta manera para el balance de asa se debe considerar la producción de 235 kg de biomasa al año, calculados de acuerdo al porcentaje de viabilidad celular.

3.4 FORMULACIÓN

La forma física de un bioinoculante es un factor determinante en el resultado práctico del producto elaborado. Éste puede variar (líquido, sólido, etc.), siempre que sea compatible con las prácticas agrícolas y de fácil incorporación a las operaciones de rutina.

Los microorganismos utilizados en pruebas de invernaderos y laboratorio funcionan de forma óptima, sin embargo, cuando se debe formular un producto comercial en base a microorganismos, para ser aplicados en el campo es un proceso más complicado (Stephens & Rask, 2000). En el producto, los microorganismos deben permanecer viables, en estado latente o metabólicamente activos (España Patente nº ES 2234417A1, 2005). El estado físico en el que se presenta el bioinoculante, tiene dos aspectos determinantes: la durabilidad del producto y la capacidad de éste para colonizar las raíces de los cultivos. El empleo de preparaciones de células libres, líquidas o en polvo, es una práctica común en la biotecnología agrícola y resulta muy efectiva cuando se trabaja con microorganismos capaces de formar estructuras de resistencia (esporas), como en el caso de bacterias del género *Bacillus spp.* Este problema tiene otro carácter cuando se trata de células que no tienen esta capacidad, ya que van perdiendo viabilidad con el tiempo y además su capacidad de supervivencia en el suelo es muy baja. Muchos de los fracasos que se han producido en el campo de la biofertilización y la bioprotección están relacionados con este fenómeno. La inoculación de

suelos con microorganismos capaces de favorecer la productividad de las plantas, es un proceso muy complejo en el cual pueden tener un efecto determinante toda una serie de factores (Bashan Y. , 1998). Por esta razón, para que el producto sea capaz de preservar la viabilidad celular en condiciones adversas durante largos periodos de tiempo y promover la capacidad de colonización de las bacterias en las raíces (España Patente nº ES 2234417A1, 2005), se pueden utilizar diferentes tipos de soportes. Un soporte es un material, líquido o sólido, sintético o natural, que protege a las bacterias tanto en su almacenamiento como en su aplicación a suelo. Las ventajas y desventajas del uso de un tipo de soporte u otro, se explican a continuación.

3.4.1 Tipos de soporte utilizados en la formulación de bioinoculantes

El tipo de soporte a utilizar, es el que define la forma física del inoculante. Esto quiere decir que si el soporte es un sólido, las bacterias se encontrarán adsorbidas en el sólido y por lo tanto la presentación final del producto tendrá las mismas características. En la Tabla 3.9, se muestran algunos ejemplos de materiales utilizados como soporte.

Tabla 3.9 Tipos de soporte para inoculantes

Tipo de inoculante	Estado	Ejemplos	Referencias
Materiales del suelo	sólido	turba, carbón, arcillas, suelos inorgánicos	(Malusá & Sas-Paszt, 2012) (Smith, 1992)
Materiales orgánicos	sólido	compost, harina de soya, salvado de trigo y aserrín	(Malusá & Sas-Paszt, 2012) (Smith, 1992)
Materiales inertes	sólido	vermiculita, perlita, caolín, bentonita y silicatos	(Malusá & Sas-Paszt, 2012; Smith, 1992)
Formulaciones líquidas	líquido	medios de fermentación, aceites minerales u orgánicos, suspensiones de aceite en agua	(Malusá & Sas-Paszt, 2012)
Polímeros sintéticos	cápsulas o gránulos	poliacrilamidas, poliestireno, y poliuretano	(Schoebitz, López, & Roldán, 2013; Dommergues, Diem, &

Tipo de inoculante	Estado	Ejemplos	Referencias
Polímeros naturales	cápsulas o gránulos	Hidrogeles extraídos de algas marinas, como alginato, carragenina, agar-agar, y agarosa (se forman por polimerización o entrecruzamiento)	Divies, 1979; Cassidy, Lee, & Trevors, 1996) (Schoebitz, López, & Roldán, 2013; Vassilev, Toro, Vassileva, Azcon, & Barea, 1997)

Fuente: Elaboración propia

Además del estado físico (sólidos en forma de polvo, gránulos o cápsulas y líquidos), los inoculantes pueden ser naturales o sintéticos, siendo algunos biodegradables y otros no. Por otro lado, el hecho de que el soporte sea un recurso renovable, también es de gran importancia, ya que la disponibilidad de materia prima, no sólo involucra un aspecto de viabilidad económica sino que también ambiental y social.

a) Formulación líquida

El modo más sencillo para el empleo de estos inoculantes es su aplicación en forma líquida, directamente a los cultivos sin experimentar procesamiento posterior a la salida del fermentador. Esta modalidad es de bajo costo, de fácil uso por el agricultor y compatible con las prácticas agrícolas sin embargo, se ha visto, que muchos microorganismos pierden rápidamente viabilidad tanto en el formulado, como en el suelo y son más susceptibles a la contaminación con otros microorganismos (Bashan, 1998).

b) Formulación en polvo

Muchos microorganismos pueden ser pulverizados directamente por liofilización, lo que permite lograr altos índices de supervivencia sin la necesidad de utilizar un soporte y permiten su almacenamiento por largos períodos a temperatura ambiente. No obstante, durante el proceso es necesario agregar algún crioprotector, el cual es esencial para proteger la membrana celular y el citoplasma en contra de la deshidratación. Algunos crioprotectores

conocidos son el manitol y la celulosa microcristalina. Los microorganismos liofilizados pueden ser a su vez mezclados con un soporte sólido o utilizados directamente en el suelo (Malusá & Sas-Paszt, 2012).

c) Turba

Los soportes más utilizados a nivel mundial en cultivos comerciales son la turba (Rose, et al., 2011), y diferentes tipos de arcillas (Goss, 2003), debido a que frente a otras alternativas, son de bajo costo y por lo tanto más utilizadas por la industria.

Los inoculantes en soporte de turba presentan una gran variabilidad química, ya que la turba, al ser una materia orgánica compleja, no es uniforme y en consecuencia hace difícil mantener la misma calidad entre lotes. Los inoculantes en base a turba normalmente presentan baja supervivencia de las células en condiciones de almacenamiento, ocupan un gran volumen y son susceptibles a la humedad. Un factor muy importante, es que se ha intentado reducir su uso, ya que no es una materia prima renovable (Bashan, y otros, 2008).

d) Arcilla

Otra técnica muy utilizada en la práctica es la adsorción. Numerosos han sido los soportes empleados con este fin. En agricultura en particular, el empleo de arcilla, vermiculita, perlita, sepiolita, caolín, tierra de diatomeas, zeolita natural y otros es de uso habitual. Las arcillas en general, pueden actuar como un desecante y proporcionar excelentes condiciones de almacenamiento para los inoculantes secos, debido a la gran área superficial, distribución del tamaño de los poros, y la porosidad total. Además, el agua puede ser controlada para proporcionar la humedad adecuada en las formulaciones biológicamente activas (Pallo, 2011). Adicionalmente, las arcillas tienen la capacidad de absorber o distribuir, agentes dispersos o suspendidos (Borges-Rodríguez, San Juan-Rodríguez, Díaz-LLanes, Gómez-Santiesteban, & Hernández-Sanchez, 2012).

e) Polímeros

Los polímeros utilizados como soportes para inoculantes, son compuestos que, en presencia de iones o cambios en las condiciones químicas, forman matrices complejas ya sea por polimerización o por entrecruzamiento. Los microorganismos quedan inmovilizados y encapsulados en la matriz y son liberados gradualmente, a medida que el polímero se degrada, lo cual tiene directa relación con la actividad del microorganismo en el suelo (Schoebitz, López, & Roldán, 2013). Formulaciones con polímeros le ofrecen al inoculante una larga vida útil, incluso a temperatura ambiente, ya que proporcionan protección contra el estrés ambiental y a diferencia de la turba, una calidad consistente en cada lote debido a la producción estandarizada (Malusá & Sas-Paszt, 2012) Estos inoculantes, se pueden mejorar mediante la incorporación de nutrientes esenciales para el crecimiento de bacterias, transformando cada cápsula en pequeños biorreactores, que son capaces de aumentar el número inicial de bacterias inmovilizadas en el suelo.

Otras ventajas asociadas a estos tipos de polímeros utilizados en la bioencapsulación de bacterias, es que son capaces de liberar las bacterias de forma controlada, protegen a los microorganismos de los distintos agentes estresantes que puedan haber en el suelo y de la contaminación durante el almacenamiento y el transporte (Schoebitz, Ceballos, & Ciampi, 2013; Bashan, Hernández, Leyva, & Bacilio, 2002).

El empleo de células inmovilizadas puede potenciar los efectos de los microorganismos sin crear problemas de contaminación, dando lugar a productos muy activos y novedosos. Una técnica que ha sido utilizada con éxito en la solución de este problema es la inmovilización por encapsulación en geles (Bashan, Hernández, Leyva, & Bacilio, 2002)

En la Tabla 3.9, se muestran distintos tipos de polímeros sintéticos o naturales, que se han utilizado para pruebas de encapsulación en inoculantes.

Hidratos de Carbono

Los hidratos de carbono tales como almidones, maltodextrinas, jarabe de maíz sólido, gomas de acacia, etc., se utilizan ampliamente para la elaboración de encapsulados mediante la técnica de pulverización en seco o spray dry (Reineccius, 1991). Entre las ventajas de estos materiales, se destacan su baja viscosidad a altos contenidos de sólidos y una buena solubilidad, que son deseables en un agente de encapsulación. Estos polímeros han sido utilizados primordialmente para encapsular diversos compuestos de la industria alimentaria y farmacéutica, como sabores y microorganismos probióticos, pero no necesariamente microorganismos para su uso como biofertilizantes. (Schoebitz, López, & Roldán, 2013)

Alginato

El alginato es el material polímero más común para la encapsulación de microorganismos para diversos fines microbiológicos industriales (Schoebitz, López, & Roldán, 2013). Es producido principalmente por algas como *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborean*, y *Eklonia cava* (Malusá & Sas-Paszt, 2012). También existen bacterias como *Azotobacter vinelandii* (Núñez, León, Guzmán, Espín, & Soberón-Chavez, 2000) y algunas especies de *Pseudomonas* que producen alginato extracelular (Fett, Osman, Fishman, & Siebles, 1986). En ambos casos, es un recurso renovable y en el caso de las algas es un recurso marino de gran abundancia en el Océano Pacífico. Este se cosecha regularmente y se procesa, principalmente para la industria de alimentos (Bashan, y otros, 2008).

Sin embargo, el alginato de sodio, también ha sido uno de los productos más utilizados para la bioencapsulación de microorganismos para agricultura (Bashan, 1986; Bashan, Hernández, Leyva, & Bacilio, 2002).

Los alginatos son polímeros naturales formados por sales o ésteres de polisacáridos como el ácido α -L-gulurónico y el ácido β -D manurónico. La inmovilización de bacterias en alginato, es posible debido a que el método es rápido, versátil y no tóxico. Disolver alginato en agua, entrega una solución viscosa la cual aumenta a medida que aumenta el largo de las macromoléculas y su solubilidad se ve afectada por el tamaño y peso molecular, el pH (a pH

menores que 3, precipita como ácido alginico) y por la presencia de cationes divalentes en agua (alginato precipita por gelificación entrecruzada con Ca^{+2} , Ba^{+2} , Sr^{+2}). La gelificación ocurre cuando los cationes de Ca^{+2} se incorporan a la cadena que une los bloques de polisacáridos dando origen a una red tri-dimensional. (Chávarri, Marañón, & Villarán, 2012).

Para una mejor disolución del alginato de sodio en agua, se recomienda agregar el polvo lentamente a medida que se agita la solución en régimen turbulento. Se requieren tiempos de aproximadamente 30 minutos para disolver completamente el alginato¹.

Selección del tipo de soporte

Las técnicas de adsorción, han sido utilizadas en gran medida, debido a su bajo costo, sin embargo han surgido nuevas técnicas como la bioencapsulación, que a pesar de que en algunos casos puede significar una mayor inversión, se ha probado que son una mejor alternativa respecto de los rendimientos de supervivencia de las células (Pallo, 2011). Dadas las ventajas y desventajas de los distintos soportes que se pueden utilizar para la formulación de inoculantes bacterianos, y teniendo en consideración todos los requisitos necesarios para ello, se utilizará como soporte, la bioencapsulación en alginato de sodio y una solución de CaCl_2 como activo gelificante. Las concentraciones a utilizar de ambos compuestos se describen en la sección 3.4.5.

Dado que el alginato es el material seleccionado como soporte para el inoculante, y cuya aplicación requiere de un proceso de encapsulación, es necesario referirse con mayor profundidad a este procedimiento. Dentro de los aspectos más importantes a considerar para la obtención de cápsulas efectivas para su aplicación en cultivos, se destacan la resistencia mecánica y el tamaño de las cápsulas.

¹ Comunicación personal con Héctor Asencio Sepúlveda, *Gerente de Investigación y Desarrollo de Kimica Chile Ltda.*, septiembre de 2014.

3.4.2 Formas de aumentar la resistencia mecánica y mejorar la calidad de la cápsula

Las perlas de alginato de calcio, se estructuran como una red flexible y en el caso de que hayan sido ocupadas para la encapsulación de medios de cultivo, éstas se encuentran llenas de una gran cantidad de agua (entre el 97 y el 98% en peso es agua) (Bashan, 1986; Nussinovitch, 2010). Por lo tanto, usar solo alginato para la bioencapsulación celular, hace que no se logre proteger adecuadamente a las células durante el proceso de secado o solidificación y en consecuencia las perlas quedan ligeramente deformadas (Schoebitz, López, & Roldán, 2013).

a) Fuentes de carbono y nutrientes

La adición de fuentes de carbono y de materia orgánica en la formulación de esferas de alginato, como por ejemplo, almidón (Schoebitz, Simonin, & Poncelet, 2012), glicerol (Tal, van Rijn, & Nussinovitch, 1997), quitina (Zohar-Perez, Chet, & Nussinovitch, 2005), leche descremada (Hernández, Weekers, Mena, Borroto, & P., 2006, Bashan, Hernández, Leyva, & Bacilio, 2002) o ácidos húmicos (Young, Rekha, Lai, & Arun, 2006), permiten aumentar la eficacia de los inoculantes, al aumentar la viabilidad de las células, y darle una mayor resistencia mecánica a las perlas aumentando la materia seca en el caso del almidón y la quitina. Específicamente para el almidón, al agregar un 47% p/v de almidón, se han reportado rendimientos del 10,4% (a_w entre 0,3 y 0,5) en células viables obtenidas luego del secado a 35°C y una supervivencia respecto del mismo tratamiento, en células encapsuladas sin adición de almidón del 9,77% mayor. Esto, debido a que la adición de almidón, permite que el contenido de humedad sea reducido hasta un 65% a una menor velocidad de secado (debido al menor contenido de humedad inicial) respecto de los tratamientos sin almidón (Schoebitz, Simonin, & Poncelet, 2012).

b) Flocculación

Otra técnica que se ha utilizado para proteger bacterias frente a las etapas de secado, es la autoinmovilización. Algunas bacterias incluyendo las del género *Azospirillum* y *Azotobacter*, tienen la capacidad de formar flóculos o quistes, (células vegetativas rodeadas por una red de

polisacáridos) cuando se encuentran en situaciones de stress. Se ha demostrado, que estas células floculadas o agregadas acumulan material capsular adicional y polímeros intracelulares, como el PHB (Okon & Itzigsohn, 1992). Estas células agregadas ricas en PHB, sobreviven mejor, ya que el PHB es utilizado como fuente de carbono y energía bajo condiciones de estrés (Lamm & Neyra, 1981). Por otra parte, la floculación provee de un microambiente que es altamente protector contra estrés físico y químico, proporcionando un nicho seguro para la supervivencia de la bacteria y la liberación de ésta. Se han reportado rendimientos del 10% ($a_w = 0,5$) en células viables obtenidas luego del secado a 40°C y una supervivencia, del 8% mayor, respecto del mismo tratamiento en células no floculadas (Joe, et al., 2012). Dadas estas ventajas, se concluye que una alternativa distinta a la adición de almidón u otro compuesto espesante o protector, es el de la encapsulación de células enquistadas (Joe, et al., 2012).

Selección de la técnica a utilizar

Para inducir la floculación, se requiere de un cambio en las condiciones de cultivo, lo cual además involucra un proceso de centrifugación, lavado y resuspensión de las células (Lamm & Neyra, 1981). Por su parte, la adición de almidón involucra añadir otra fuente a parte del medio de cultivo, lo cual también podría aumentar los costos. A diferencia de la floculación, el almidón le confiere propiedades adicionales y ventajosas a la cápsula.

De acuerdo a esto, se opta por añadir almidón como una alternativa para mejorar la estabilidad mecánica de la cápsula, la reducción del contenido de humedad inicial y la durabilidad de ésta en el suelo, ya que se ha demostrado que aumenta significativamente los rendimientos de viabilidad celular tras la etapa de secado y tras su aplicación en los cultivos (Schoebitz, Ceballos, & Ciampi, 2013).

3.4.3 Sobre el tamaño de la cápsula

c) Macroesferas

La formulación experimental más común para los inoculantes bacterianos son las macroperlas o macroesferas con un diámetro de 1-4 mm. Sin embargo, su tamaño relativamente grande es desventajoso para usos agrícolas (Bashan, Hernández, Leyva, & Bacilio, 2002; Bashan, 1998).

En prácticas agrícolas, cuando las esferas se mezclan libremente con las semillas y se siembran de manera conjunta, las esferas pueden caer lejos de la semilla (hasta algunos centímetros). Las bacterias liberadas de las esferas deben moverse a través del suelo, encarando la competencia de la flora nativa y algunas veces la ausencia de una película continua de agua necesaria para su movimiento. Estas distancias pueden ser restrictivas para muchas bacterias benéficas, aún aquellas con movilidad probada en el suelo, tal como *Azospirillum spp.* Para superar tales dificultades, recientemente se concibió el concepto de microesfera. Si las esferas son suficientemente pequeñas pero aún son capaces de encapsular un número significativo de bacterias, será posible producir una formulación en forma de polvo (Bashan, y otros, 2008).

d) Microesferas

Para producir esferas más pequeñas, existen dos posibilidades: Aplastar mecánicamente las macroesferas, o producir microesferas directamente, utilizando una tecnología apropiada (Bashan, Hernández, Leyva, & Bacilio, 2002)

La producción de microesferas de alginato que se ha realizado a escala laboratorio es simple y se obtienen al rociar la solución de alginato a través de una punta muy fina (Bashan *et al.*, 2002). Esta tecnología produce esferas de un tamaño de 50 a 200 μm , en las cuales quedan atrapadas un número significativo de bacterias (aproximadamente 10^8 a 10^9 UFC g^{-1}), similar a los valores que se obtienen en macroesferas de alginato (Bashan, 1989).

Selección del tamaño

De acuerdo a los estudios revisados, en la mayoría de los casos los diámetros logrados son del orden de los 4 [mm] para las cápsulas húmedas (ver Tabla. B.2, Apéndice B). Debido a que existen otros factores adicionales que están asociados al tamaño de la esfera, como por ejemplo la técnica de encapsulación a utilizar, la composición de la cápsula, la viscosidad de la mezcla y el grado de hidratación, entre otros, es muy difícil tomar una decisión definitiva respecto del tamaño óptimo. Si bien anteriormente se mencionó que para su uso agrícola las microcápsulas eran más convenientes, son más difíciles de manejar durante el proceso de elaboración, sobretodo en el caso de la etapa de secado. Como alternativa se propone un tamaño de cápsula promedio de 2 [mm] de diámetro (húmeda). Para obtener la relación peso/volumen, se consideró que ésta se mantiene constante independiente del tamaño, por lo que se utilizaron las mismas relaciones obtenidas de la experiencia de (Schoebitz, Simonin, & Poncelet, 2012; Schoebitz, Ceballos, & Ciampi, 2013). Las características de la cápsula a producir se resumen en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10 Características de la cápsula de acuerdo al tamaño seleccionado

parámetro	cápsula húmeda	cápsula seca	unidad
contenido de humedad*(bh)	68,3%	9,1%	% p/p
diámetro	2	1	[mm]
volumen	0,0042	0,0005	[mL]
peso	6,50	2,35*	[mg]
densidad cápsula	1,6	4,5*	[g/mL]

*se obtiene de la sección b).

3.4.4 Concentración de la Biomasa

Los principales métodos utilizados para separar las células del caldo de cultivo son la filtración, la microfiltración y la centrifugación. Cuando el procedimiento requerido es aumentar la concentración celular sin separarla totalmente del medio de cultivo (como es el caso), es preferible utilizar un equipo de centrifugación. En cuanto al tipo de centrifuga a utilizar para las más comunes en procesos industriales son las centrifugas tubulares y las centrifugas de disco.

a) Centrífuga tubular

Las centrifugas tubulares consisten básicamente de un tubo vertical que gira a altas velocidades por la acción de un motor eléctrico y otra fuente de energía. Este tipo de centrifugas son capaces de separar partículas hasta de $0,1 \mu\text{m}$. Modelos típicos de escala industrial giran hasta con 15.000 rpm desarrollando campos de gravedad de hasta 12.000 G, con capacidades entre 500 y 3500 L/h. Ya que este tipo de centrifugas no tienen descarga continua o automática de sólidos, la torta debe ser descargada manualmente y la capacidad de sólidos es de 2 a 4 kg/lote (Tejeda, Montesinos, & Guzmán, 1995). Las centrifugas tubulares son utilizadas mayoritariamente en separaciones dificultosas que requieren de grandes fuerzas centrífugas (Doran, 2013).

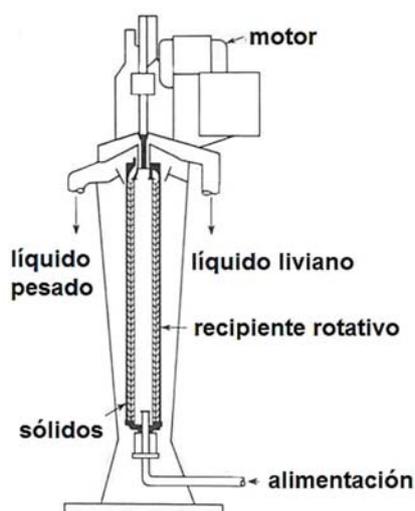


Fig. 3.1 Diagrama representativo de una centrífuga tubular

b) Centrífuga de discos

La centrífuga de discos consta de un eje vertical sobre el cual se montan un conjunto de discos en forma de conos truncados, uno sobre el otro. El rotor de la centrífuga provoca el giro tanto de los discos como del tazón. Los discos tienen pequeñas separaciones entre ellos (0,2 a 2 mm) y el ángulo que forman los conos con la vertical varía entre 35° y 50° , dependiendo de la aplicación. Entre los discos y el tazón existe un espacio que permite la acumulación de sólidos (ver .). Las centrifugas de disco pueden ser de descarga continua o intermitente para los

sólidos y pueden ser de retención o de tazón abierto (con boquillas o nozzles), lo cual le da un mayor rango de aplicación a nivel industrial (Tejeda, Montesinos, & Guzmán, 1995). Generalmente, las fuerzas centrífugas para centrífugas de disco varían entre 5.000 y 15.000 G y los caudales que operan son entre 4 y 1.500 L/min (Tejeda, Montesinos, & Guzmán, 1995).

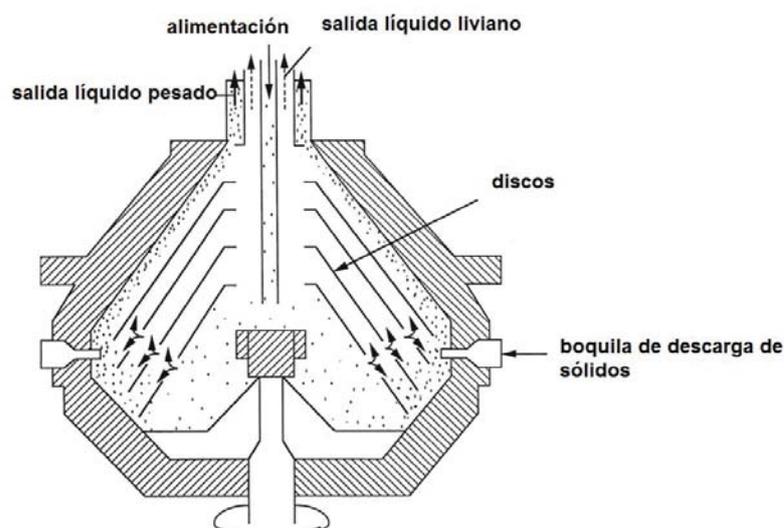


Fig. 3.2 Diagrama representativo de una centrífuga de discos

Selección de la técnica a utilizar

Se escoge la centrífuga de discos con boquillas de descarga para sólidos, debido a que para este proceso se necesita concentrar la biomasa de tal forma que ésta permanezca como un fluido. La centrífuga de discos con boquillas para la descarga de sólidos necesariamente debe operar con sólidos que aún tengan un alto contenido de humedad para que puedan ser descargados (Doran, 2013), a diferencia de la centrífuga tubular que separa los sólidos dejándolos con bajo contenido de humedad, los cuales necesariamente hay que rasparlos abriendo el equipo. Se selecciona la centrífuga de descarga intermitente, ya que para la escala de este proceso no se justifica el aumento de costo entre una centrífuga de descarga continua y una intermitente².

² Comunicación personal con Sergio Salvo, *Ingeniero de ventas de GEA Westfalia Separator Chile S.A.*, noviembre 2014

3.4.5 Preparación de la mezcla a encapsular y otras consideraciones

Para determinar la cantidad de alginato, almidón, biomasa y CaCl_2 adecuadas para una escala industrial, es necesario tomar en cuenta resultados obtenidos en investigaciones a escala laboratorio. En las publicaciones encontradas, los autores presentan distintas proporciones de biomasa, alginato y almidón utilizadas, que han resultado en encapsulaciones efectivas de células o de compuestos químicos, pero obteniendo rendimientos y características finales de las cápsulas a veces muy distintas.

En la Tabla. B.2 del Apéndice B, se indican los diferentes estudios revisados, las concentraciones de alginato, biomasa y almidón que se utilizan, la concentración celular por gramo de cápsula y los tamaños de las cápsulas que se obtienen en cada caso. La relación masa de alginato/ masa de almidón utilizadas varían desde 0,03 hasta 0,2 y la relación en masa de alginato y biomasa se mueve entre los 0,8 y 11 g de alginato /g de biomasa. Luego, no se pueden sacar conclusiones de acuerdo a la relación óptima alginato/almidón y alginato/biomasa en peso, sin realizar pruebas de viabilidad y de calidad de las cápsulas obtenidas específicas para el caso. En esta evaluación, se considerará una relación de alginato/biomasa igual a 2 y una relación de almidón/alginato de 10, ya que se considera pertinente de acuerdo a lo conversado con expertos y de acuerdo a los costos de las materias primas.

La concentración de alginato en la mezcla antes del proceso de extrusión, se debe encontrar entre 20 y 30 g/L y la concentración de almidón entre 200 y 500 g/L (Chan, et al., 2011; Schoebitz, Simonin, & Poncelet, 2012; Iavnova, Teunou, & Poncelet, 2006), para concentraciones de biomasa en la mezcla que varían de acuerdo al autor.

Para obtener el volumen al cual se deben mezclar estas proporciones, es necesario fijar una de las concentraciones, siendo en este caso más conveniente fijar la concentración de biomasa en UFC/ml, ya que le da cierto grado de estandarización al proceso. La concentración de biomasa en la mezcla, se obtiene de acuerdo a los requerimientos del producto, ya que la cantidad de células atrapadas por cápsula depende de la concentración inicial de biomasa en la mezcla a extrusar y de la eficiencia de encapsulación (Rojan, Tyagi, Brar, Surampalli, &

Prévost, 2011). Si bien no hay normativa o consenso establecido acerca del contenido de unidades formadoras de colonias mínimo por gramo de producto, un valor aceptable, para asegurar una población mínima luego de largos períodos de almacenamiento es de $>10^9$ UFC/g (Schoebitz, Ceballos, & Ciampi, 2013). De acuerdo a los balances realizados, con una concentración de aproximadamente 17 g/L de biomasa en la mezcla antes del proceso de extrusión, se obtiene un producto con un contenido de unidades formadoras de colonias mayor a la señalada (ver sección 4.4).

Cabe destacar, que el equipo seleccionado para la preparación de la mezcla a encapsular es un estanque de mezclado, cuyo agitador es de paletas inclinadas debido a la alta viscosidad a la cual puede llegar la mezcla (2.200 cP) (ver sección 5.4). Estos agitadores han sido especificados para la disolución de alginatos y compuestos relacionados (Greaves, 2014). El mezclador seleccionado carece de sistema de calefacción, ya que la disolución tanto del alginato, como del almidón, se realizan a temperatura ambiente^{1,4}.

Para el caso de la solución de CaCl_2 , la difusión del ion Ca^{+2} a través del gel de alginato depende de un gradiente de concentración y del tiempo de residencia (o de reacción) de las cápsulas en el estanque de gelificación (Lee & Rogers, 2012). Valores típicos de concentración de CaCl_2 se encuentran entre los 10 y 15 g/L y tiempos de residencia de 30 min (Schoebitz, Simonin, & Poncelet, 2012; Chan, et al., 2011; Iavnova, Teunou, & Poncelet, 2006).

¹ Comunicación personal con Héctor Asencio Sepúlveda, *Gerente de Investigación y Desarrollo de Kimica Chile Ltda.*, septiembre de 2014.

⁴ Comunicación personal con Dr. Mauricio Schoebitz, *Dr. en Ingeniería de Procesos Agroalimentarios, Universidad de Nantes, Francia*, noviembre de 2014.

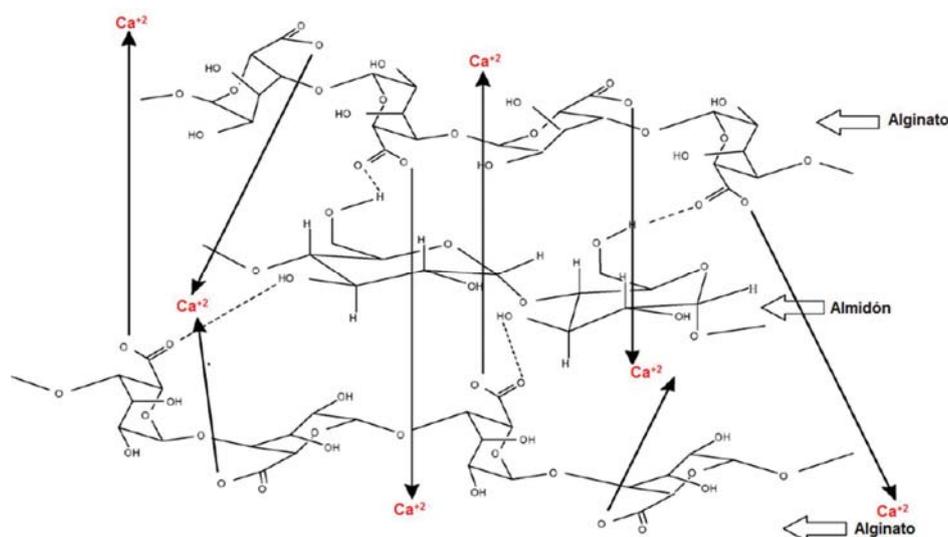


Fig. 3.3 Estructura de la cápsula de alginato-almidón- Ca^{+2}
Fuente: (Singh, Sharma, & Gupta, 2009)

A escala laboratorio, el volumen de solución de CaCl_2 es 4 a 5 veces el volumen a extrusar³, sin embargo esta proporción a escala piloto o industrial es demasiado grande y se necesitaría una gran cantidad de CaCl_2 para llegar a concentraciones de 10-15 g/L. Para efectos de esta evaluación, se considerará una concentración de 15 g/L y como volumen mínimo de solución de CaCl_2 se considerará doble del volumen ocupado por las cápsulas, consideradas como pequeños cubos con aristas del tamaño del diámetro. Además, se realizará el cálculo estequiométrico considerando que 1 mol de Ca^{+2} reacciona con 2 moles de ácido gulurónico (Blandino, Macías, & Cantero, 1999), de tal forma de obtener la máxima masa de Ca^{+2} retenida en el gel de alginato, tal como se muestra en la Fig. 3.3. Se considera además el uso de un alginato con alto contenido de ácido gulurónico, como es el caso del alginato extraído de la corteza externa del alga *Laminaria hyperborea*, la cual tiene un 75% de ácido gulurónico y un 25% de ácido manurónico (Draget, Smidsrod, & Skjak-Braek, 2005).

A modo de resumen, las concentraciones seleccionadas de biomasa, alginato de sodio y almidón, en la mezcla a extrusar y de CaCl_2 en la solución gelificante, se encuentran en la Tabla 3.11.

³ Comunicación personal con Dra. Araceli Olivares Miralles, *Dr. en Cs. de la Ingeniería m/Ingeniería Bioquímica –PUCV*, octubre de 2014.

Tabla 3.11 Concentración de los compuestos en la mezcla a extrusar y en la solución gelificante

Compuesto	Concentración (g/L)
Biomasa	17,25
Alginato de Sodio	34,5
Almidón	345
CaCl₂	15

3.4.6 Encapsulación

La encapsulación ha sido un tema ampliamente estudiado por la industria alimentaria y por la industria farmacéutica, destacándose entre las principales técnicas físicas, el secado en spray o atomización, el sistema de lecho fluido y la extrusión. Entre las técnicas químicas destacan la inclusión molecular y la polimerización interfacial, y entre las técnicas que se basan en principios físico-químicos destacan la coacervación, el uso de liposomas, la gelificación iónica, la gelificación inversa y las emulsiones en aceite.

El proceso de bioencapsulación requiere de 3 etapas principales. La primera de ellas es la incorporación del ingrediente activo en estado líquido o sólido. Enseguida se requiere la dispersión del ingrediente por medio de las técnicas mecánicas disponibles. Finalmente, se requiere un proceso de estabilización, el cual puede ser químico (polimerización), físico-químico (gelificación o coacervación) o físico (evaporación o solidificación) formando gotitas o pellets directamente durante la segunda etapa. Depende de la técnica a utilizar, el proceso puede requerir más de una etapa, lo que incluye el uso de más de una de las técnicas nombradas anteriormente (Schoebitz, López, & Roldán, 2013). En la Tabla. B.1 del Apéndice B, se pueden observar distintas técnicas y algunas de sus ventajas y desventajas. De las alternativas de uso industrial, se destacan algunos tipos de extrusión, el secado en Spray y el recubrimiento por lecho fluidizado.

a) Métodos de Extrusión

Cuando un líquido se bombea para ser pasado a través de una boquilla, este primero se extrude en forma de gotas individuales. Si se aumenta la velocidad del flujo lo suficiente, la gota se transforma en un chorro continuo el cual puede ser transformado en pequeñas gotitas utilizando algún método de corte (ver Fig. 3.4).

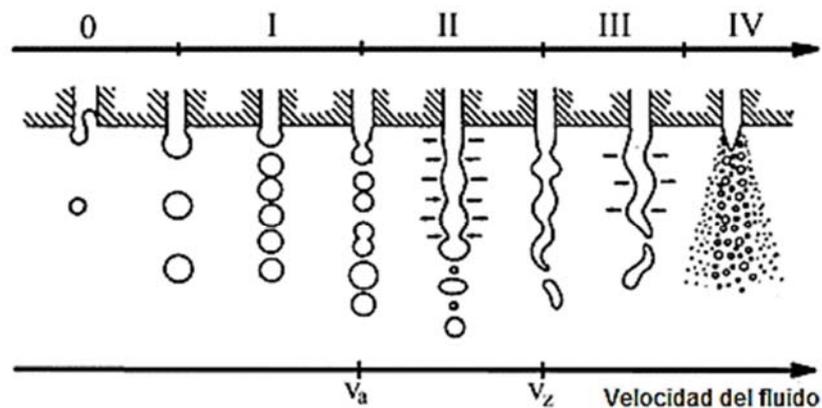


Fig. 3.4 Diferentes mecanismos de formación de la gota de acuerdo al aumento de flujo
Fuente: (Heinzen, Berger, & Marison, 2004)

Así, los métodos de extrusión se pueden dividir en dos grandes grupos y el límite entre ellos está establecido de acuerdo a la velocidad mínima para formar un chorro y éste no se transforme en gotas.

Las diferentes técnicas de extrusión para ambos casos se señalan en la Fig. 3.5.



Fig. 3.5 Diferentes técnicas de extrusión según la velocidad del flujo
Fuente: Adaptado de (Chávarri, Marañón, & Villarán, 2012)

Dentro de las desventajas de utilizar la técnica de extrusión, es que después de ser extruidas, las cápsulas resultantes son lanzadas a una solución solidificante o gelificante, que se encuentra en estado líquido, por lo que este proceso requiere de una etapa posterior de secado. Para asegurar la supervivencia de las bacterias, es necesario utilizar una técnica adecuada para remover la humedad y asegurar un buen almacenamiento. (Bashan, y otros, 2008).

Para trabajar a escala industrial, las alternativas que existen en la actualidad y que permiten ser escalables, son las de corte por vibración y las de corte con disco cortante (Schoebitz, López, & Roldán, 2013; Chávarri, Marañón, & Villarán, 2012).

Corte por vibración

La tecnología de vibración se basa en el principio de un chorro de líquido de caudal laminar, que se deshace en microgotas uniformes debido a una vibración superpuesta. La frecuencia de vibración seleccionable determina la cantidad de gotículas producidas, por ejemplo una frecuencia de vibración de 700 Hz genera 700 microgotas por segundo (Heinzen, Berger, & Marison, 2004).

Parámetros que influyen en el proceso son la longitud de onda, la viscosidad dinámica y la tensión superficial del líquido. Sabiendo estos parámetros se puede obtener la frecuencia

óptima de operación y el diámetro de la cápsula resultante (Chávarri, Marañón, & Villarán, 2012).

La ventaja más importante de la tecnología de vibración, es que es posible reproducir cápsulas de forma esférica, con diámetros en el rango de 2 mm hasta 0,1 mm con una distribución del tamaño homogénea. Además, esta técnica es de fácil escalamiento ya que consiste en la multiplicación del número de boquillas, por lo que solamente es necesario el desarrollo de dispositivos multiboquillas. El único desafío es que cada boquilla debe operar en condiciones de producción similares: la misma frecuencia, longitud de onda y velocidad del fluido. De esta manera, el escalado es directo desde el laboratorio (10 g) a una escala piloto o industrial (100 kg/batch) (Heinzen, Berger, & Marison, 2004).

En términos de productividad, equipos a escala laboratorio producen hasta 6000 capsulas por segundo lo que corresponde a aproximadamente 2,4 L/h, dependiendo de las condiciones utilizadas.

Una gran desventaja de la tecnología de vibración, es su uso limitado respecto a líquidos que tienen una mayor viscosidad (Prüsse, et al., 2008).



Fig. 3.6 Equipo de encapsulación por vibración para escala laboratorio (Büchi, Labortechnik AG)

Disco cortante

El disco cortante es un tipo de encapsulación, que permite la producción de cápsulas con una alta viscosidad. En este método, el fluido transcurre a través de una boquilla y luego, éste es cortado en segmentos de forma uniforme con el uso de una rueda de corte rotativa. Debido a la tensión superficial, estos segmentos forman microcápsulas cuando precipitan. El diámetro de las microcápsulas es el resultado del número de alambres, la velocidad de rotación de la rueda de corte y la masa de fluido que pasa a través de la rueda de corte.

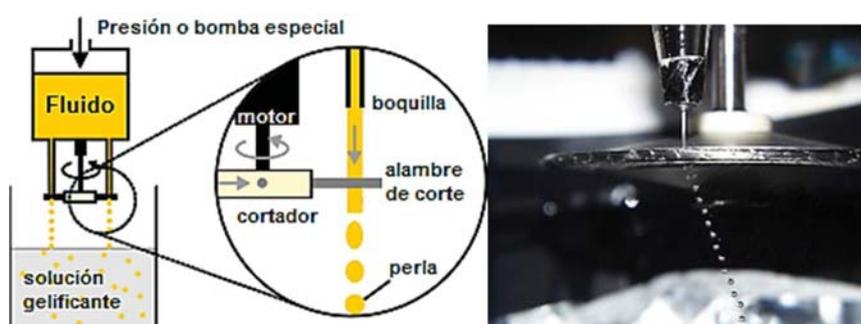


Fig. 3.7 Diagrama del equipo JetCutter (geniaLab) y representación de la formación de las esferas debido al impacto con la rueda de corte
Fuente: (Prüsse & Vorlop, 2004)

En la siguiente tabla se pueden observar productividades teóricas a dos diferentes frecuencias 5.000 y 10.000 Hz (Prüsse & Vorlop, 2004).

Tabla 3.12 Productividades teóricas en dos diferentes frecuencias.

Los valores de productividad están por unidad de L/(h·boquilla). El valor se puede multiplicar cuando se utiliza el sistema multiboquillas

Diámetro / mm	5,000 Hz	10,000 Hz
0.2	0.08	0.15
0.4	0.60	1.21
0.6	2.04	4.07
0.8	4.83	9.65
1.0	9.42	18.8
1.5	31.8	63.6

Diámetro / mm	5,000 Hz	10,000 Hz
2.0	75.4	151

Fuente: (Prüsse & Vorlop, 2004)

Estos equipos son de fácil escalamiento, lo cual se puede lograr de dos diferentes formas: La primera, es utilizando multiboquillas, lo que permite multiplicar la productividad por número de boquillas y la segunda es aumentando la frecuencia corte, ya sea aumentando la velocidad de rotación del motor o aumentando el número de alambres en el disco de corte. Se pueden lograr frecuencias de hasta 25.000 Hz, lo que equivaldría a 45 (L/h boquilla) para un diámetro de partícula de 1 mm o casi 380 (L/h boquilla) para un diámetro de 2 mm.

Dentro de los parámetros más importantes a considerar, se destacan la relación de las velocidades del alambre de corte y del fluido, necesarias para determinar el ángulo de inclinación adecuado, de tal forma de evitar el máximo de pérdidas. La velocidad del fluido, a su vez también está relacionada con el tamaño de las cápsulas, mientras que el diámetro de la boquilla y el alambre determinan el volumen de corte que se pierde.

La principal desventaja es la pérdida relativamente importante de polímero en cada corte, a pesar de que parte se puede reciclar a la alimentación. Para limitar esta pérdida la velocidad lineal del fluido y la del alambre de corte, debiesen ser iguales. Si el equipo es utilizado correctamente, las pérdidas no superan el 2% del volumen procesado (Prüsse & Vorlop, 2004).

Una de las grandes ventajas de esta técnica, es que se puede tratar material biológico a bajas temperaturas, debido a que no se necesita calentar para disminuir la viscosidad. Esta técnica permite encapsular fluidos con viscosidades de 0,2 a 110 (Pa·s).

b) Atomización

El método de secado por atomización o *Spray drying* es el método de encapsulación más comúnmente utilizado en la industria de los alimentos, es un método económico y flexible y produce una buena calidad de productos. Este proceso, consiste en una dispersión del

compuesto o en este caso microorganismo que se desea encapsular y una solución de polímero, seguido de la homogenización con la solución solidificante y la atomización al interior de una cámara a alta temperatura. Esto conlleva a la evaporación del solvente y, por lo tanto, la formación de las microcápsulas. Las partículas secas son traspasadas a un ciclón, donde ocurre la separación por fuerza centrífuga. Requiere además el uso de una bomba y un intercambiador de calor (Chávarri, Marañón, & Villarán, 2012).

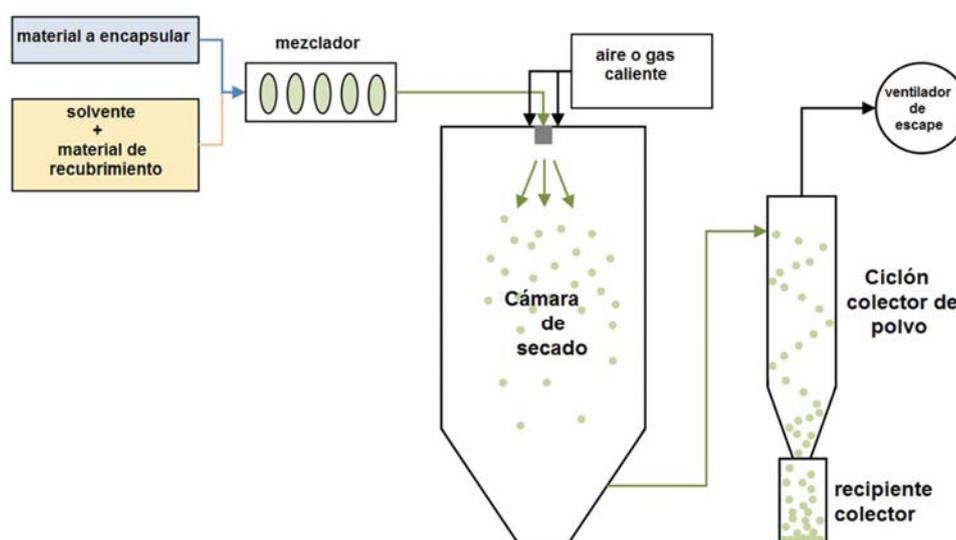


Fig. 3.8 Esquema de un proceso de encapsulación por atomización
Fuente: (Chávarri, Marañón, & Villarán, 2012)

La ventaja de este proceso es que puede ser operado de forma continua y a diferencia de la extrusión no requiere de un proceso posterior de secado ya que en este caso tanto la formación, como el secado de las microcápsulas, suceden en la misma cámara. El inconveniente de este método es la alta temperatura utilizada (100-180°C), que puede afectar la viabilidad de organismos vivos, tales como microalgas y bacterias que no resisten altas temperaturas (Schoebitz, López, & Roldán, 2013).

c) Lecho Fluido

La formación de microesferas por pulverización en lecho fluido es un proceso utilizado para evitar algunos problemas de la técnica de spray dry, debido a que permite el uso de menores temperaturas en la cámara de secado (35-40°C) (González & Hernández, 2007). El material sólido se suspende en una corriente de aire en una cámara de revestimiento, de tal manera que la corriente de aire provoca un flujo cíclico de las partículas (ver Fig. 3.9). Una boquilla en la parte inferior de la cámara, pulveriza el material de recubrimiento sobre las partículas. Las partículas son transportadas a la parte superior de la cámara, donde se solidifica el material de revestimiento, y las partículas caen de nuevo para recibir un segundo recubrimiento. Este proceso se repite hasta que el espesor de recubrimiento deseado se consigue (> 150 µm) (Marison, Peters, & Heinzen, 2004).

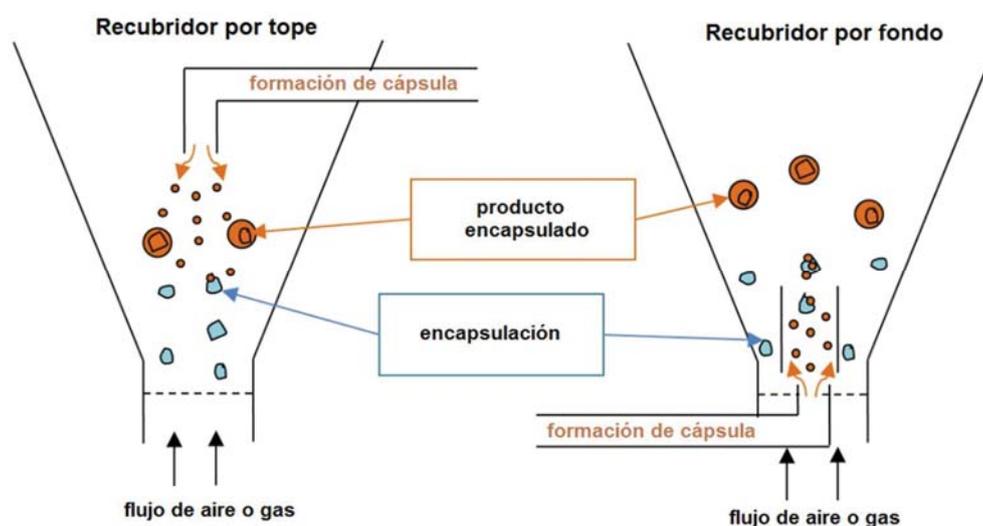


Fig. 3.9 Esquema de dos de los tipos más comunes utilizados en encapsulación por lecho fluido

Fuente: (Chávarri, Marañón, & Villarán, 2012)

La circulación adecuada de las partículas, es la clave para asegurar que todas las partículas en el lecho fluido, logren un recubrimiento uniforme. Las técnicas más utilizadas son, la pulverización por fondo, por tope; y otras variaciones como las tangenciales (Chávarri, Marañón, & Villarán, 2012).

Si bien esta tecnología es bastante viable para ser utilizada a escala industrial, no se encontraron registros específicos de microencapsulación de bacterias en alginato, mediante la técnica de revestimiento en lecho fluido. Es por esto, que no se tiene claro el rendimiento y la viabilidad celular que se puede lograr mediante este proceso.

Selección del tipo de técnica a utilizar para la bioencapsulación

De las técnicas descritas, las que presentan mayores ventajas son las de extrusión, ya que por un lado, la técnica de “spray dry” limita debido a las altas temperaturas de operación requeridas y por el otro, se sabe que para lecho fluidizado el material debiese ser sólido y fluidizable, y en este caso, el material a encapsular es una mezcla viscosa con alto contenido de humedad.

De todas las posibles técnicas de extrusión, se ha demostrado que la tecnología de disco cortante es la mejor técnica para ser utilizada a nivel industrial (aunque también es posible utilizarla a escala laboratorio) y su mayor ventaja es que permite utilizar soluciones viscosas. En diversos estudios realizados, se han obtenido resultados exitosos con concentraciones de hasta un 4% p/p de alginato, mientras que la tecnología por vibración, a pesar de que también es una técnica escalable a nivel industrial, no permite el uso de soluciones muy viscosas (hasta un 2% p/p) (Prüsse, et al., 2008).

Dada las indicaciones del proveedor del equipo Jetcutter (geniaLab) para las condiciones de la mezcla a encapsular, se utilizan velocidades de 5 a 7 [g/s] por boquilla para lotes de 100-200 L y cápsulas de 1-2 mm. De acuerdo al volumen a encapsular, se calculará el número de boquillas necesarias para lograr una mejor productividad.

3.4.7 Secado de las cápsulas

Si bien el proceso de secado afecta la viabilidad de las células y disminuye los rendimientos en la producción de bioinoculantes, se ha demostrado que la disminución de la actividad de agua en las cápsulas, permite mantener constante la viabilidad de las bacterias en períodos

largos de almacenamiento (1-2 años) y evita la posible proliferación de microorganismos indeseados (Schoebitz, Simonin, & Poncelet, 2012; Hernández & López, 2009).

En el caso de encapsulación de bacterias sensibles a la temperatura, aún no se han realizado pruebas suficientes y no se ha llegado a un consenso acerca de la mejor alternativa para secar las cápsulas. Dado que la elección de una técnica en especial sin realizar pruebas de secado previas es muy difícil, se consultaron dos personas expertas en encapsulación, quienes plantearon su opinión al respecto. A continuación se presentan las distintas alternativas discutidas.

a) Liofilización

La liofilización consta de un proceso de deshidratación, en el que se congela el producto y luego se reduce la presión permitiendo que el agua se separe por sublimación directamente de la fase sólida a la fase gaseosa. Una de las ventajas más importantes es que se evita la oxidación en la transición de fase del agua (Chávarri, Marañón, & Villarán, 2012). Los factores que controlan el gradiente de presión de vapor, son la presión en la cámara de secado, la temperatura del condensador de vapor y la temperatura del hielo en la sublimación (Nussinovitch, 2010).

La liofilización es una técnica utilizada frecuentemente para el almacenamiento de células, y siempre que éstas, estén provistas de un agente protector, se pueden garantizar tasas de supervivencia mayores al 80% en condiciones óptimas. Sin embargo, en una de las referencias revisadas, cuyas condiciones y características de las cápsulas son bastante similares a las propuestas en este trabajo, se señalan pérdidas de un 92% de viabilidad celular luego de la liofilización (Chan, et al., 2011).

Otra gran desventaja de del secado por liofilización, son los altos costos que involucra muchas veces significativamente mayores a las otras técnicas (Marison, Peters, & Heinzen, 2004).

b) Lecho fluido

La técnica de lecho fluido utilizada como secado posterior a la encapsulación es una buena alternativa para su uso a gran escala, ya que permite utilizar bajas temperaturas, como se mencionó anteriormente. En este caso, el secado se realizaría por fondo y las microcápsulas serían dispuestas en la cámara de secado.

En un secador de lecho fluidizado el tiempo de residencia puede ser fijado independientemente de la temperatura del aire de entrada, de manera que se puede evitar el sobrecalentamiento de partícula. El secado por lecho fluidizado ofrece importantes ventajas sobre otros métodos de secado de materiales particulados, ya que permite una distribución uniforme de la temperatura, y altas tasas de transferencia de calor y de masa. Las propiedades de las partículas resultantes se determinan por las condiciones de operación mencionadas anteriormente (Jacquot & Perneti, 2004).

c) Secadores de bandeja

Los secadores de bandeja constan de una cámara aislada donde los sólidos son distribuidos en las bandejas ubicadas a distintos niveles. La transferencia de calor en estos secadores puede ser directa mediante una corriente de aire que circula a través de la cámara o indirecta utilizando bandejas calientes, radiadores o paredes refractantes dentro de la cámara. Generalmente los que funcionan de manera indirecta, requieren de una pequeña cantidad de aire que retire la humedad o bien pueden funcionar a vacío donde el agua es retirada por la misma bomba que genera el vacío (Green & Perry, 2008).

Estos secadores no son agitados y se utilizan para procesos cuyo secado se realiza por lotes y de pequeña escala. Para procesos de mayor escala, estos secadores no son frecuentemente utilizados ya que el trabajo asociado a la carga y descarga del secador puede significar altos costos (Green & Perry, 2008). Por otro lado, debido que los sólidos no se encuentran en movimiento, la transferencia de calor no es muy eficiente por lo que los tiempos de secado y exposición del material al calor son mayores.

d) Secadores rotatorios

Los secadores rotatorios consisten en una carcasa cilíndrica que gira sobre un eje y por lo general se encuentra inclinado respecto a la horizontal entre 1 y 5°. El producto húmedo es introducido en el extremo superior de la secadora y luego es retirado en el extremo inferior. Estos secadores pueden transferir el calor de forma directa, utilizando aire o gases de secado, e indirecta a través del calentamiento de tubos internos o de las paredes del secador mediante vapor o algún fluido caliente. En el caso de los secadores directos el aire puede ser alimentado en flujo co-corriente, contra-corriente o de forma cruzada. En el caso de los secadores indirectos, estos pueden utilizar vacío para operar en condiciones de evaporación a temperaturas más bajas (para productos sensibles a la temperatura) o al igual que en los secadores de bandeja, se hace pasar una pequeña corriente de aire que remueva el agua evaporada. Generalmente estos secadores son utilizados para procesos en el que el secado se debe realizar de forma continua y comúnmente se utilizan en plantas de gran escala. Sin embargo, también existen algunos secadores que operan por lotes aunque son menos comunes. Los secadores rotatorios muchas veces constan de baffles en su interior para ayudar a mover los sólidos cuando la carcasa está girando, promoviendo el contacto entre el sólido húmedo y el aire caliente (Mujumdar, 2006).

Selección de la técnica de secado

En primera instancia es necesario destacar que el secado de las cápsulas debe ser realizado por lotes, por dos sencillas razones: el proceso entero se realiza por lotes y las cantidades a secar son pequeñas (90 -100 kg de cápsulas por lote) y no justifican un proceso continuo. En segunda instancia se debe señalar que la técnica de secado a utilizar depende de muchos factores siendo uno de los más importantes el tipo de bacteria involucrada. Por último, se debe mencionar que la remoción del agua libre es un proceso rápido, lo cual no significa un gran aumento de temperatura para el sólido. Sin embargo, la remoción de la humedad ligada suele ser bastante complicada y puede durar largos períodos, siendo no sólo la temperatura la que puede afectar la viabilidad sino que también el proceso de difusión del agua desde los poros de la cápsula hasta la superficie.

De acuerdo a lo conversado con los expertos se llegaron a las siguientes conclusiones:

El secado por liofilización es bastante caro en comparación con el resto, y para la escala que se desea producir no es conveniente.

El lecho fluidizado podría ser una alternativa para tamaño de partícula más pequeño, y tendría que ser del tipo vibratorio debido a que las cápsulas son bastante pegajosas cuando están húmedas. Sin embargo los resultados son bastante inciertos ya que se han realizado pruebas en las que se han obtenido rendimientos de un 35% de viabilidad (Hernández & López, 2009) y pruebas en las que se han obtenido rendimientos del 0%⁴. De acuerdo a esto, sería necesario realizar pruebas piloto específicas para el caso de tal forma de obtener los parámetros adecuados de operación.

Los secadores de bandeja son los que más se utilizan a escala laboratorio y de los cuales más se tiene información acerca de los rendimientos de viabilidad celular. Sin embargo, como se mencionó anteriormente para una escala piloto o industrial no es la mejor alternativa ya que los tiempos de secado son mayores y la carga y descarga del material a secar puede volverse engorroso.

Por último, el secador rotatorio de contacto directo fue considerado como mejor alternativa de acuerdo a la recomendación de un experto⁵. Si bien el secador rotatorio a vacío podría ser una buena opción para secar las cápsulas a baja temperatura y corto tiempo, se desconoce el efecto que pueda causar el vacío y es probable que las cápsulas se destruyan. Es por esto que se propone un secador de tipo rotatorio directo, levemente inclinado respecto de la horizontal, con baffles y con perforaciones en toda la superficie del tambor donde el aire entra por estos orificios (semejante a una secadora de ropa), permitiendo diferentes zonas de

⁴ Comunicación personal con Dr. Mauricio Schoebitz, *Dr. en Ingeniería de Procesos Agroalimentarios, Universidad de Nantes, Francia*, noviembre de 2014.

⁵ Comunicación personal con Dr. Denis Poncelet, *Presidente del grupo de investigación "Bioencapsulation Research Group"*, noviembre de 2014.

temperatura. La corriente de aire en este caso sería de tipo cruzado y podría aumentar la eficiencia de secado.

Acorde a lo señalado anteriormente y teniendo en cuenta que no se dispone de la curva de secado de las cápsulas, desconociendo el valor de la humedad crítica y humedad de equilibrio, se ha decidido realizar el diseño de un secador rotatorio de contacto directo similar al descrito por el experto, considerando una operación por lotes donde el aire entra por uno de los dos extremos. La temperatura del aire de secado se define en 40° C, ya que una temperatura mayor podría provocar una mayor pérdida de viabilidad celular (Ivanova, Teunou, & Poncelet, 2006), (Schoebitz, Simonin, & Poncelet, 2012), (Hernández & López, 2009).

3.4.8 Diagrama del Proceso

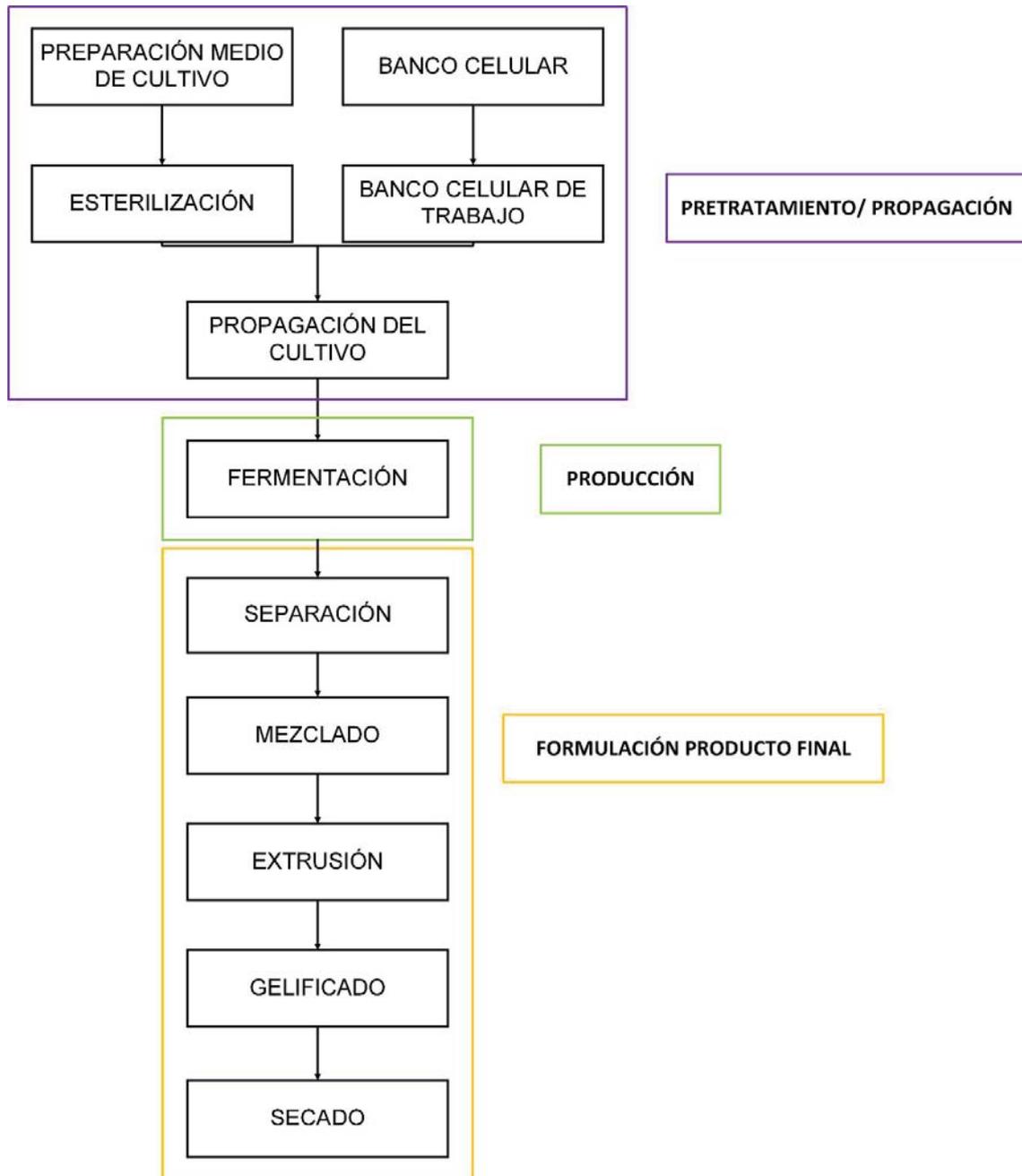


Fig. 3.10 Diagrama del Proceso

CAPÍTULO 4

BALANCE DE MASA Y ENERGÍA

El siguiente capítulo presenta los balances correspondientes a cada operación unitaria o etapa del proceso para la producción de bioinoculantes, además de cada uno los flujos involucrados con su correspondiente composición y magnitud.

De acuerdo en lo descrito en la sección 2.6, la producción anual para el 2024 se calculó en base al 20% de las hectáreas posibles a cubrir, lo que equivale a 235.000 ha. De esta manera se define también que la cantidad de aplicaciones apropiada de producto es de 2 aplicaciones/ha y de 10^{11} UFC/ha de microorganismo (Bashan & Holguin, 1998). Considerando que el peso de una bacteria con forma de bacilo alargado es del orden de 10^{-12} gr y que la producción por lote es de alrededor 6 g/L, se determina que la producción anual para el 2024 es de 82 kg de biomasa por microorganismo. Debido a que en la etapa de formulación existen procesos que reducen tanto la viabilidad celular como la pérdida de masa, se determina una eficiencia del proceso, lo que conlleva a producir una mayor cantidad de biomasa que la estimada por la demanda potencial. La eficiencia global del proceso es de aproximadamente un 35%, por lo que la producción anual para el 2024 se incrementa a 235 kg de biomasa.

A continuación se presenta el diagrama representativo del proceso de producción de bioinoculantes (Fig. 4.1) y posteriormente el diagrama incluyendo corrientes de servicio (Fig. 4.2). El resumen general de las corrientes y la identificación de los equipos se encuentran en el diagrama de flujo adjunto al final del informe.

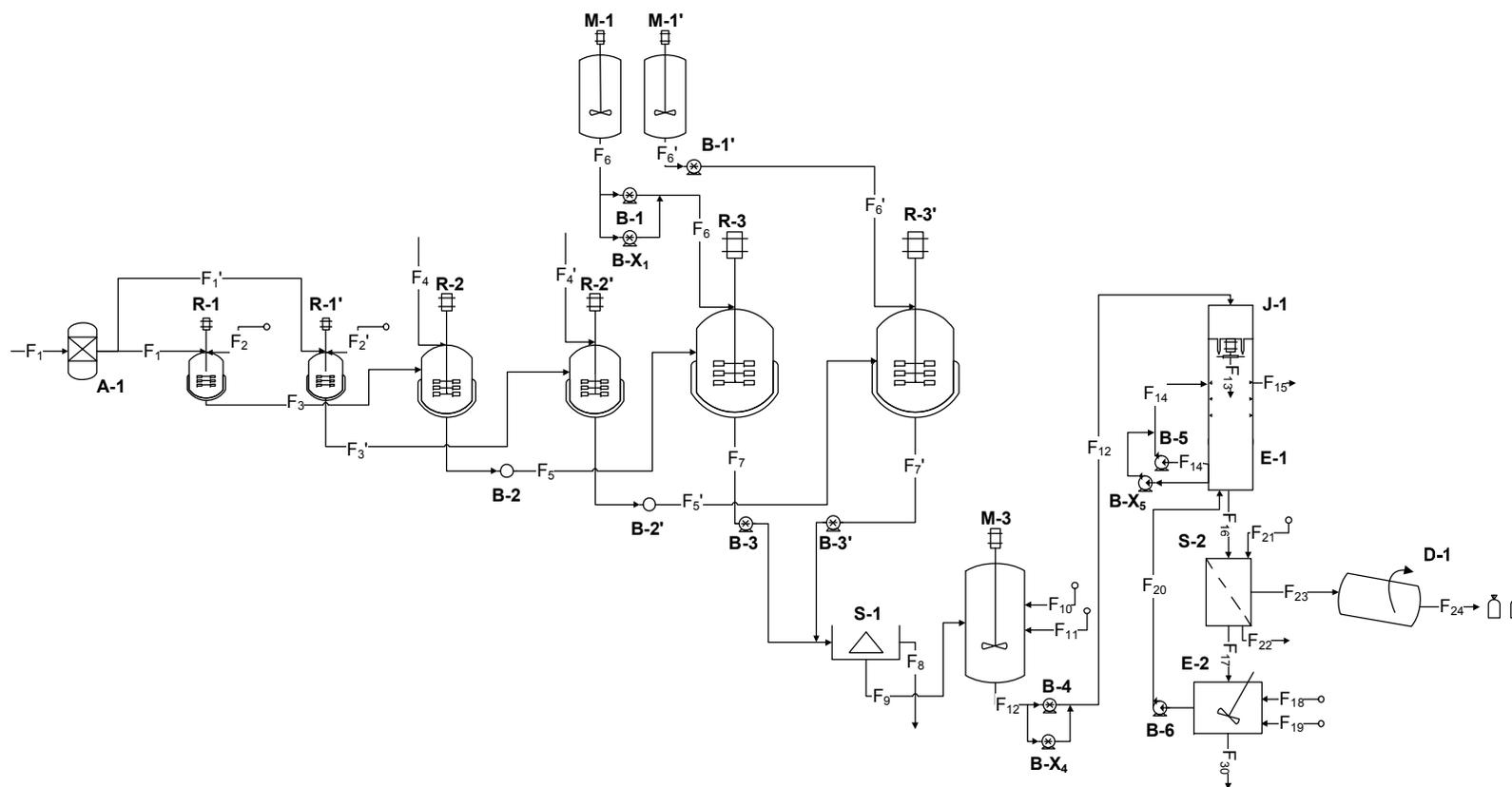


Fig. 4.1 Diagrama representativo del proceso de producción de bioinoculantes encapsulados

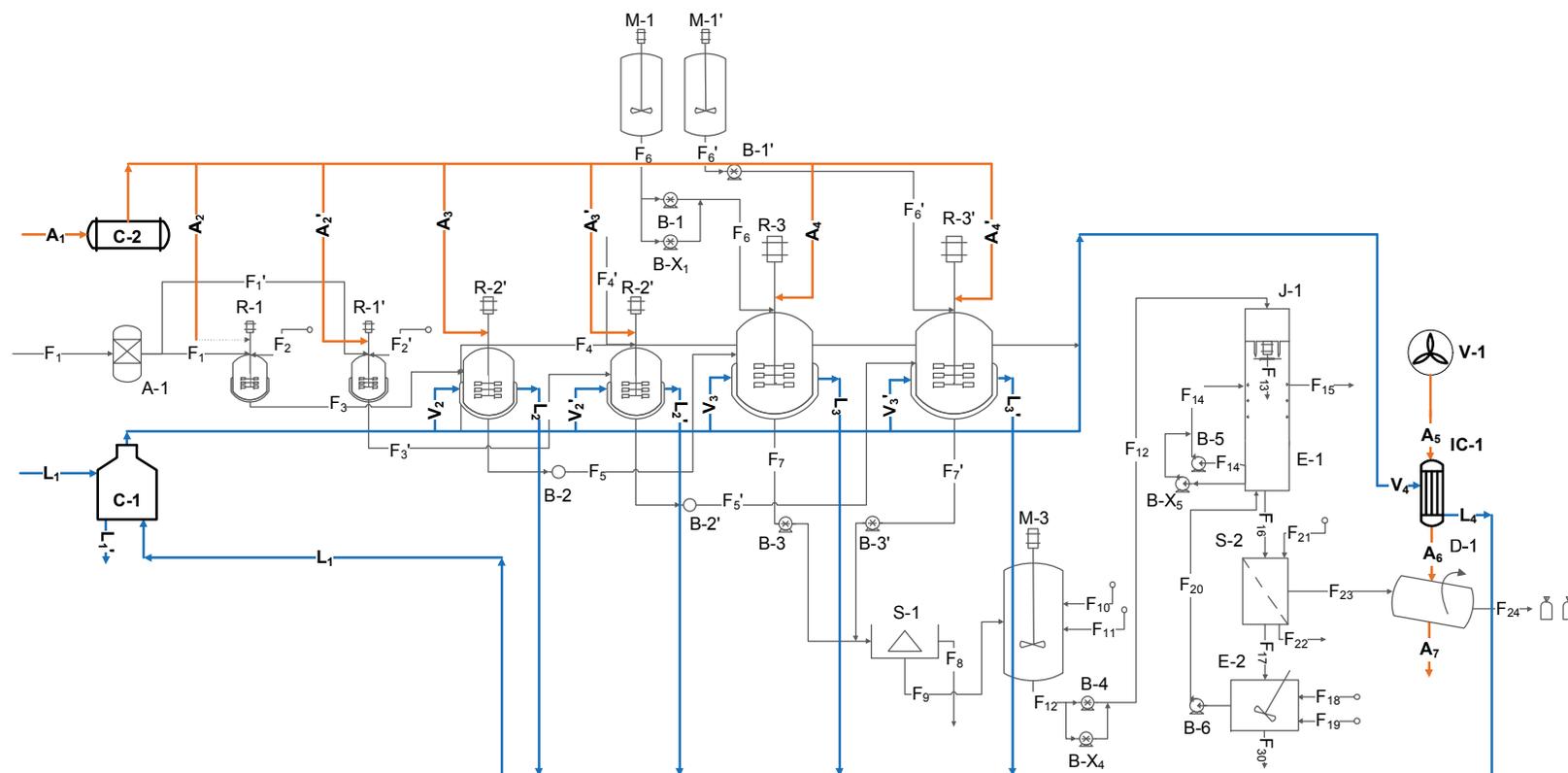


Fig. 4.2 Diagrama representativo de los flujos de servicio del proceso

4.1 BALANCE DE MASA ETAPA DE FERMENTACIÓN

4.1.1 Cultivo de *Azotobacter vinelandii*

El fin del proceso de propagación es proporcionar el inóculo de tamaño adecuado para la fermentación principal de la cual se obtendrá la biomasa, para su posterior tratamiento y formulación del producto. Esta etapa consta de una serie de fermentaciones sucesivas dentro de las cuales están: cultivo en matraz de 300 ml, cultivo en fermentador de 3L y cultivo en fermentador de 30L. Cada cultivo es inoculado con el cultivo anterior y alimentado con medio de cultivo Burk fresco, a excepción del primer matraz que es inoculado a partir de un cultivo sólido del microorganismo. La Fig. 4.3 ilustra el sistema de propagación.

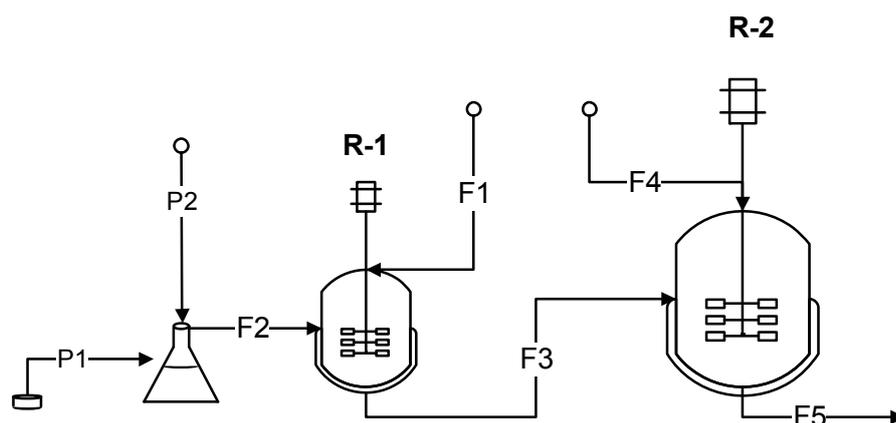


Fig. 4.3 Diagrama del proceso de propagación

Como se menciona en el Capítulo 3, existen dos líneas de producción, una para cada microorganismo. De acuerdo a la Ecc. 3.1, cada flujo i de la línea L1 es igual al de la línea L1', por lo que solo se ilustrará en las tablas el consumo de una línea y no ambas de manera de no ser redundante, ya que es el mismo valor.

Para este balance de masa se consideran las siguientes características del medio de cultivo.

Tabla 4.1 Características de los fluidos involucrados

Flujo	Parámetro	Valor	Unidades
Medio de cultivo	densidad	1000	kg/m ³
Caldo de cultivo	densidad	1050	kg/m ³
Caldo de cultivo	viscosidad	1	cP

a) Propagación en matraz

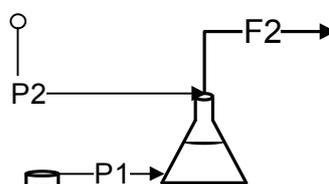


Fig. 4.4 Diagrama propagación en matraz

Tabla 4.2 Descripción de corrientes representadas en la Fig. 4.4

Corriente	Descripción
P ₁	Biomasa sólida
P ₂	Medio de cultivo
F ₂	Inóculo R1

Mediante 3 asadas de un cultivo sólido se inocula un matraz de 300 ml, el que puede alcanzar una concentración máxima final de biomasa de 4 g/L (Peña, Galindo, & Büchs, 2011).

El valor de los parámetros de crecimiento celular para el cálculo del aumento de biomasa en el matraces de 300 ml de capacidad se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4.3 Parámetros de crecimiento de *A. vinelandii* en medio Burk modificado en cultivo de 100ml.

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
μ	0,11	h^{-1}	(Peña, Galindo, & Büchs, 2011)
X_f	4	g/L	(Peña, Galindo, & Büchs, 2011)
$Y_{x/s}$	0,254	g/g	(Peña, Galindo, & Büchs, 2011)

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{-\Delta S}$$

Ecc. 4.1

Donde:

$Y_{x/s}$: rendimiento sustrato en biomasa g biomasa/g sustrato

ΔX : crecimiento biomasa g/L

ΔS : consumo sustrato g/L

Considerando el rendimiento de sustrato en biomasa de la Tabla 4.3 y teniendo en cuenta que el inóculo es aproximadamente un 10% de la biomasa final, 4 g/L, reemplazando en la Ecc. 4.1 se obtiene una concentración final de sacarosa de:

$$S_f = 5,81 \text{ g/L}$$

Este valor se obtuvo utilizando una concentración inicial de sacarosa de 20 g/l, como indica el medio Burk, definido en la Tabla 3.7; se modificará la concentración de sacarosa debido que no es el nutriente limitante, al tener un remanente de aproximadamente el 25% de su concentración inicial, puesto que no es óptimo tener un remanente de la fuente de carbono. Para alcanzar la concentración de 4 g/L el medio se modifica tal que $S_0 = 15 \text{ g/L}$, de manera de tener un remanente de sacarosa inferior 5%.

De acuerdo a esta medida se determina la composición de las corrientes en la etapa de propagación en matraces.

Tabla 4.4 Descripción de corrientes de propagación en matraz de 300 ml

Flujo	B [g]	M [g]
P ₁	0,086	-
P ₂	-	224,914
F ₂	0,860	224,140

Para determinar el tiempo de cultivo se utiliza la Ecc. 4.2, durando así cada cultivo 21 h.

$$X_f = X_0 e^{\mu t}$$

Ecc. 4.2

b) Propagación en fermentadores

La siguiente figura muestra la etapa de propagación en fermentadores, etapa que recibe el flujo F₂ de la propagación en matraz, siendo este de 225 g por lote. Con este flujo es inoculado el reactor R-1 de 3 L además de ser alimentado con medio de cultivo por F₁.

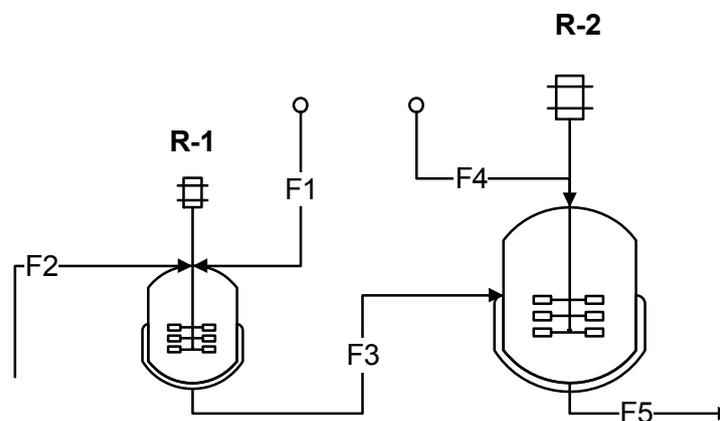


Fig. 4.5 Diagrama de propagación en fermentadores

Para determinar el aumento de biomasa respecto al consumo de sustrato se utilizan los datos de la Tabla 4.5 para el reactor de 3L y Tabla 4.6 de 30 L.

Tabla 4.5 Parámetros de crecimiento de *A. vinelandii* en medio Burk modificado en cultivo de 2 L

	Valor	Unidad	Referencia
μ	0,23	h^{-1}	(Díaz, Altamirano, Gutierrez, & Martínez, 2013)
X_f	4,2	g/L	(Díaz, Altamirano, Gutierrez, & Martínez, 2013)
$Y_{x/s}$	0,205	g/g	(Díaz, Altamirano, Gutierrez, & Martínez, 2013)

Tabla 4.6 Parámetros de crecimiento de *A. vinelandii* en medio Burk modificado en cultivo de 10 L

	Valor	Unidad	Referencia
μ	0,17	h^{-1}	(Díaz, Altamirano, Gutierrez, & Martínez, 2013)
X_f	5,8	g/L	(Díaz, Altamirano, Gutierrez, & Martínez, 2013)
$Y_{x/s}$	0,285	g/g	(Díaz, Altamirano, Gutierrez, & Martínez, 2013)

Se considera que los datos obtenidos por Díaz para el cultivo de 10 L son extrapolables al cultivo de 30L ya que $Y_{x/s}$ es de alrededor 0,2-0,3 g/g y μ en el intervalo de 0,08 – 0,2 h^{-1} en cultivos en bioreactor de *A. vinelandii*.

Mediante la Ecc. 4.1 y considerando que con el medio Burk modificado el microorganismo es capaz de agotar toda la sacarosa, se calculan los flujos correspondientes a la etapa de propagación en fermentadores.

Tabla 4.7 Descripción de corrientes de propagación en fermentadores de 3 L y 30 L.

Flujo	Biomasa [g]	M [g]
F ₁	-	2.025,00
F ₂	0,86	224,14
F ₃	9,64	2.240,36
F ₄	-	20.250,00
F ₅	131,79	22.368,21

El tiempo de cada cultivo en cada fermentador se calcula con la Ecc. 4.2 , de manera de obtener el tiempo total necesario para realizar un lote completo. Con los datos de la Tabla 4.5, Tabla 4.6 y Tabla 4.7 se determina que el tiempo de fermentación para el fermentador de 3 L es de 10,5 h y para el de 30 L es de 15,5 h.

a) Etapa de producción

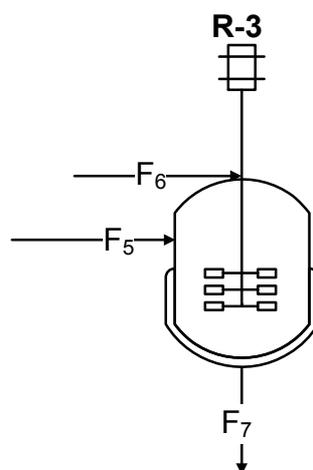


Fig. 4.6 Diagrama de fermentación principal en reactor de 300 L

La Tabla 4.8 indica los flujos correspondientes a la corriente de alimentación del fermentador de 300 L, la corriente de inoculación proveniente del fermentador de 30 L y la corriente de salida del caldo de cultivo. Para la etapa de producción también se utilizan los parámetros de la Tabla 4.6, de esta manera, los flujos másicos se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 4.8 Descripción de corrientes en fermentadores de 300 L.

Flujo	Biomasa [g]	M [g]
F ₅	131,79	22.368,21
F ₆	-	202.500,00
F ₇	1353,22	223.646,78

La duración del cultivo en fermentador de 300 L es de 13,7 h, de esta manera, el tiempo total de un lote es de 64 horas, lo que comprende la etapa de propagación en matraces,

propagación en fermentadores y producción en reactor principal. Este tiempo considera solo lo necesario por cada cultivo para crecer, no tomando en cuenta los tiempos de llenado, vaciado, y otras actividades que puedan involucrar más tiempo, debido que serán considerados en el Capítulo 6.

La corriente de salida F_7 con un flujo de 214 L/lote presenta las siguientes características:

Tabla 4.9 Características corriente F_7

Corriente	F_7	Unidades
Biomasa	1353,22	[g]
Sacarosa	0	[g]
Medio remanente	223.646,78	[g]
Densidad	1050	[kg/m ³]
Viscosidad	1	[cP]

4.1.2 Demanda de oxígeno

La demanda de oxígeno del microorganismo se define por la Ecc. 4.3.

$$N_A = \frac{\mu \cdot X}{Y_{O_2}} = q_{O_2} \cdot X$$

Ecc. 4.3

Donde:

N_A : velocidad de consumo de oxígeno [g/L·h]

X : concentración de biomasa residual [g/L]

q_{O_2} : velocidad específica de consumo de oxígeno [mmol/g·h]

Se utilizan datos bibliográficos de (Díaz, Altamirano, Gutierrez, & Martínez, 2013) obtenidos en cultivo de bioreactor de 3 y 14 L.

Tabla 4.10 Velocidad de consumo de oxígeno en cultivo de bioreactor

Escala bioreactor	q_{O_2} [mmol/g·h]
3 L	0,23
14 L	1,060

Para determinar la tasa específica de aireación, generalmente expresada por vvm, volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto, se usa la Ecc. 4.4.

Cabe destacar que debido a la alta tasa de respiración de *A. vinelandii* se utiliza una TOD del 1%, considerando datos experimentales los cuales han alcanzado valores muy cercanos a 0. El aire suministrado posee un 21% v/v de oxígeno.

$$vvm = \frac{F_a}{V}$$

Ecc. 4.4

$$vvm = \frac{N_a \cdot T \cdot 22,4}{1000 \cdot N_{O_2} \cdot E \cdot \pi \cdot 273 \cdot 60}$$

Ecc. 4.5

Donde:

T: temperatura de la fermentación, [K]

π : presión atmosférica, [atm]

N_{O_2} : porcentaje de oxígeno en el aire alimentado

E: eficiencia de absorción de oxígeno: 0,17 (promedio del rango establecido 3%-30% (Acevedo, Gentina, & Illanes, 2002))

Para que el crecimiento no este limitado por oxígeno se considera que la velocidad de consumo de oxígeno es igual a la de transferencia:

$$N_A = VTO$$

Ecc. 4.6

De esta manera se determina el parámetro de $k_L a$ mediante la Ecc. 4.6 reemplaza en la Ecc. 4.7

$$VTO = k_L a \cdot (C_L^* - C_L)$$

Ecc. 4.7

Donde la concentración de saturación de oxígeno disuelto y la concentración de oxígeno disuelto está dada por las siguientes ecuaciones:

$$C^* = \frac{P \cdot N_{O_2}}{H}$$

Ecc. 4.8

$$C_L = \frac{C_L^* \cdot \%OD}{100}$$

Ecc. 4.9

Donde:

P: presión atmosférica [atm]

H: constante de Henry a 30°, 0,028 [atm·L/mg]

%OD: porcentaje de saturación de oxígeno disuelto

Los resultados de los requerimientos de oxígeno para las fermentaciones de propagación y principal se muestran en la tabla Tabla 4.11.

Tabla 4.11 Requerimientos de oxígeno en R1, R2 y R3

Parámetro	R1	R2	R3	Unidad
N_a	1,195	2,086	2,142	g O ₂ /L·h
vvm	0,434	0,757	0,777	1/min
F_A	0,929	16,213	166,487	L/min
$k_L a$	160,970	280,954	288,491	1/h

4.1.3 Cultivo de *Azospirillum brasilense*

No fue posible encontrar datos tan explícitos como los mencionados en la sección 4.1.1 para la cepa de *Azospirillum*. Solo se dispuso de información bibliográfica acerca de cultivos a escala laboratorio, todos con distintos medios de cultivos complejos y optimizados específicamente para la cepa de *Azospirillum*. Debido a la escasez de datos, es que se selecciona la (España Patente nº 2093559, 1997), (ver Apéndice E) ya que fue la única fuente que describe de forma detallada y a escala piloto la obtención de biomasa de *Azospirillum* en medio Burk modificado. Debido a que en la patente no se presentan valores de velocidad específica de crecimiento, no se puede realizar un balance de masa como tal para esta bacteria, pero considerando que son ambas son bacterias fijadoras de nitrógeno, utilizan el mismo medio y poseen una velocidad específica de crecimiento muy similar, se asume que para *Azospirillum* el cálculo es prácticamente el mismo.

4.2 BALANCE DE ENERGÍA

Para realizar el balance de energía en la etapa de fermentación se plantea la siguiente ecuación

$$Q_F + Q_A = Q_P + Q_R$$

Ecc. 4.10

Donde:

Q_F : calor generado por el metabolismo celular [kcal/L·h]

Q_A : calor por agitación [kcal/L·h]

Q_P : calor disipado por las paredes del fermentador [kcal/L·h]

Q_R : calor retirado por el sistema de refrigeración [kcal/L·h]

El calor generador por el metabolismo celular se puede calcular mediante la relación con la demanda de oxígeno.

$$Q_F = 0,12 \cdot \frac{N_A \cdot 1000}{PM_{O_2}}$$

Ecc. 4.11

El calor generado por agitación se considera que es un 10% del calor de fermentación (Acevedo, Gentina, & Illanes, 2002).

Para el cálculo del calor disipado por las paredes del fermentador se supone que la pared alcanza una temperatura constante igual a la del caldo de cultivo y que la temperatura ambiente también es constante.

$$Q_P = h \cdot \pi \cdot T \cdot H_L \cdot (T_f - T_a)$$

Ecc. 4.12

Donde:

h: coeficiente de convección del aire, 20 kcal/h·m²·°C

π: número pi

T: diámetro del fermentador [m]

H_L: altura del líquido en el fermentador [m]

T_f: temperatura de fermentación, 30°C

T_a: temperatura ambiente, 15 °C

La altura del líquido depende del volumen de fermentación y está determinado por la relación indicada en la Tabla 5.5.

De esta manera de la Ecc. 4.10 se despeja el calor retirado por el sistema de refrigeración; en la siguiente tabla se muestra los calores para los equipos R-1, R-2 y R-3.

Tabla 4.12 Resultados del balance de energía de la etapa de fermentación

Parámetro	R1	R2	R3	Unidad
Q _F	9,6	167,6	1721,3	kcal/h
Q _A	0,96	16,7	172,1	kcal/h
Q _P	9,2	43,7	197	kcal/h

Parámetro	R1	R2	R3	Unidad
Q_R	1,4	140,7	1696	kcal/h

Para determinar el flujo de agua y el área de contacto necesaria para enfriar el fermentador se iguala el calor retirado por el sistema de refrigeración en las Ecc. 4.13 y Ecc. 4.14 de manera de determinar el flujo de agua necesario y área del serpentín.

$$Q_R = M \cdot Cp \cdot (T_s - T_e)$$

Ecc. 4.13

$$Q_R = U \cdot A_S \cdot LMTD$$

Ecc. 4.14

Donde:

M: flujo másico de agua necesario para retirar Q_R

C_p : calor específico del agua, 1 kcal/ kg·°C

T_e : temperatura entrada del agua de enfriamiento 15°C

T_s : temperatura salida del agua de enfriamiento 25 °C

U: Coeficiente global de transmisión de calor, 600 Kcal/h·m²·°C

LMTD: Diferencia media de temperaturas corregida.

A_S : Área de intercambio m²,

$$A_S = 2\pi r L_S$$

Donde:

r: radio serpentín m

L_S : largo serpentín m

Los resultados obtenidos del dimensionamiento del serpentín y el agua de enfriamiento necesaria para la esterilización se muestran en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13 Resumen agua enfriamiento y dimensiones del serpentín

Parámetro	R1	R2	R3	Unidad
M	0,14	14,07	169,63	kg/h

Parámetro	R1	R2	R3	Unidad
As	0,0002	0,026	0,31	m2
L	1	32	178	cm

Considerando que la fermentación se realiza en paralelo y en un total de 87 lotes, en la Tabla 4.14 se muestra el gasto de agua anual.

Tabla 4.14 Resumen consumo anual agua por enfriamiento

	Agua enfriamiento anual [m ³]	Agua enfriamiento anual [m ³]
R1	0,0001	0,01
R1'	0,0001	0,01
R2	0,0	1,2
R2'	0,0	1,2
R3	0,2	14,8
R3'	0,2	14,8
Total	0,37	32

4.2.1 Esterilización

Debido que el proceso de producción de bioinoculantes no es un proceso de características estéril, se diseñará solo la esterilización de los reactores R2 y R3 con su medio de cultivo dentro. Para ello se considera una esterilización discontinua dentro del reactor, siendo el serpentín el medio por el cual fluye el vapor procedente de la caldera. Los datos del vapor son los siguientes

Tabla 4.15 Características vapor de caldera

Parámetro	Valor	Unidades
λ_{vap}	2202,20	kJ/kg
Presión	2	bar
Temperatura	121	°C

Para determinar la cantidad de vapor necesario, se debe hacer un balance de energía al sistema, determinar el calor necesario para calentar el medio de cultivo a la temperatura de esterilización; de esta manera se deben igualar las ecuaciones Ecc. 4.13 y Ecc. 4.15 para obtener la masa de vapor necesaria.

$$Q = M \cdot \lambda_v$$

Ecc. 4.15

Donde:

Q: Calor de esterilización kJ

M: masa de vapor kg

λ_{vap} : entalpía de vaporización de agua a 121°C y 2 bar, kJ/kg

Tabla 4.16 Características de fluidos en zona de calentamiento

Parámetro	R2	R3	Unidad
Cp medio de cultivo		4,18	kJ/kg°C
T_e		15	°C
T_s		121	°C
Masa medio cultivo	22,5	225	kg
Q_{calentamiento}	9.969	99.693	kJ

Para la zona de mantención se estima que la cantidad de vapor necesario es el mismo que para la fase de calentamiento. Los reactores después de ser esterilizados se dejaron enfriar a temperatura ambiente de manera de ahorrar en gasto de agua. En caso de necesitar enfriar rápidamente el reactor hasta la temperatura de fermentación luego de ser esterilizado, el consumo de agua para enfriamiento sería el siguiente:

Tabla 4.17 Características del fluido a enfriar

Parámetro	R2	R3	Unidad
Cp medio de cultivo		4,18	kJ/kg°C

Parámetro	R2	R3	Unidad
T_e	121		°C
T_s	30		°C
Masa medio cultivo	22,5	225	kg
$Q_{\text{calentamiento}}$	-8.559	-85.586	kJ
Masa agua	137	1.365	kg

Tabla 4.18 Cantidades requeridas de vapor y agua para esterilización

Parámetro	R2	R3	Unidad
Masa vapor calentamiento	4,5	45,3	kg
Masa vapor mantención	4,5	45,3	kg
Masa agua enfriamiento	136,5	1365	kg

4.3 CONCENTRACIÓN DEL CULTIVO CELULAR MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN

a) Balance de materia

Esta etapa tiene como objetivo concentrar la biomasa de tal forma de obtener un producto final que asegure una cantidad mínima de [UFC/g] de bioinoculante. Además, la concentración permite trabajar con volúmenes menores y permite la reducción de la cantidad de materia prima a utilizar para la encapsulación.

Una vez finalizada la fermentación, se bombea la corriente (F_7) proveniente del fermentador, a una centrífuga de discos, obteniéndose una corriente rica en biomasa (F_9) y una corriente rica en productos de la fermentación (en aquellos casos en que existe producto) y agua (F_8) (ver Fig. 4.7).

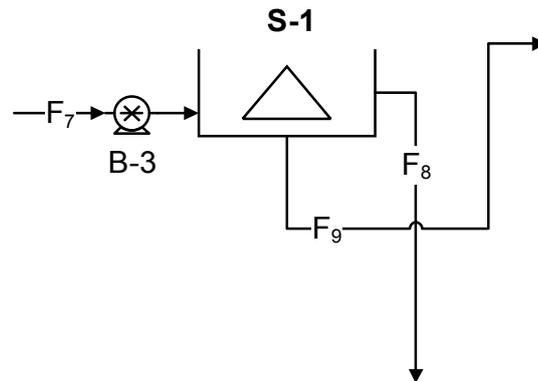


Fig. 4.7 Diagrama Separador Centrífugo (S-1)

El balance general a la etapa de separación se describe de acuerdo a la Ecc. 4.16:

$$F_7 = F_8 + F_9$$

Ecc. 4.16

Considerando una eficiencia de separación del 95%, se obtiene la biomasa en el concentrado de acuerdo a la Ecc. 4.17:

$$B_9 = B_7 * \text{eficiencia de separación}$$

Ecc. 4.17

Si existieran productos de la fermentación, estos debiesen incluirse en el balance siempre que se encuentren en una cantidad significativa de tal forma que pudiesen afectar en los cálculos. De no ser así, es posible descartarlos como se ha considerado en este caso.

La corriente F_9 se obtiene a partir de lo requerido para lograr la concentración necesaria de células en el producto final (ver sección 4.4).

Una vez calculada la masa total de la corriente F_9 , se obtiene la cantidad de agua en el concentrado (W_9). Esto permitirá obtener el parámetro de operación de la centrífuga para su posterior diseño.

Realizando el siguiente balance, se obtiene W_9

$$W_9 = F_9 - B_9$$

Ecc. 4.18

Con el valor de la corriente F_9 , se obtiene la corriente F_8 mediante la Ecc. 4.16 y se asume que para las tres corrientes (F_7 , F_8 y F_9) la densidad es igual a 1,05 [kg/L].

Los resultados del balance de esta etapa se encuentran en la Tabla 4.19

Tabla 4.19 Resultados del balance de masa de la etapa de concentración mediante centrifugación para un lote

Flujo	B [kg]	W [kg]	Total [kg]
F_7	1,353	223,65	225,00
F_8	0,068	170,03	170,10
F_9	1,286	53,62	54,90

b) Balance de energía

Durante la etapa de centrifugación se genera un leve aumento de la temperatura en las corrientes de salida, ya que se genera calor producto de la rotación de la centrifuga. Este aumento de temperatura se puede obtener planteando el siguiente balance:

$$Q_7 + (1 - \eta) * W = Q_9 + Q_8 + Q_p$$

El cual se puede expresar acorde a la Ecc. 4.19:

$$f_7 * Cp_7 * (T_7 - T_{ref}) + (1 - \eta) * P_W = f_8 * Cp_8 * (T_8 - T_{ref}) + f_9 * Cp_9 * (T_9 - T_{ref}) + Q_p$$

Ecc. 4.19

Donde:

P_w : potencia eléctrica que consume el equipo transformada en trabajo mecánico y calor; 1,1 [kW] (ver sección 5.3).

η : eficiencia energética de la centrifuga; considerada como un 70%

C_p : Capacidades caloríficas promedio de las corrientes de entrada y salida [kJ/kg °C]

T_i, T_{ref} : Temperatura de las corriente de entrada, salida y referencia [°C]

f_i : flujo másico en [kg/s] obtenido de acuerdo al caudal de alimentación para el cual fue seleccionada la centrifuga (ver sección 5.3).

Q_p : Calor disipado correspondiente al 10% de la potencia eléctrica consumida por la centrifuga.

Las capacidades caloríficas son calculadas de acuerdo a la composición de la mezcla y son consideradas constantes para un rango de T° entre 0 y 50 °C. Además, se asume que la temperatura de salida es la misma para ambas corrientes, es decir $T_8=T_9$.

Se consideró una temperatura de 30 °C para la corriente de entrada a la centrifuga y 0°C para la temperatura de referencia. La eficiencia energética de la centrifuga (η) se estimó en un 70%.

En la Tabla 4.20 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.20 Resultados del balance de energía de la etapa de concentración mediante centrifugación para un lote

Flujo	f [kg/s]	Cp [kJ/kg °C]	T [°C]	Q [kW]
F₇	0,1458	4,16	30	18,21
F₈	0,1102	4,18	30,50	14,05
F₉	0,0356	4,12	30,50	4,47
Qp	-	-	-	0,03
Qext	-	-	-	0,33

4.4 MEZCLADO

a) Balance de materia

Esta etapa consiste en mezclar alginato de sodio en polvo (F_{10}), el cual tiene un contenido de humedad del 15% (Sigma-Aldrich, 2014a) y almidón en polvo (F_{11}), con un contenido de humedad del 18% (Sigma-Aldrich, 2014b), con el medio de cultivo concentrado (F_9) para obtener una corriente homogénea (F_{12}) la cual entrará al equipo extrusor (ver Fig. 4.8).

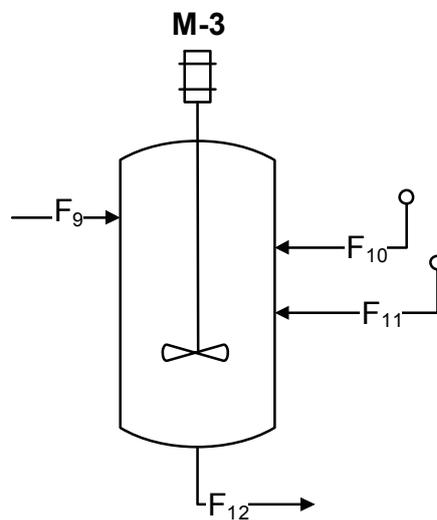


Fig. 4.8 Diagrama de equipo mezclador (M-3)

El balance general de esta etapa se describe por la ecuación Ecc. 4.20

$$F_{12} = F_{10} + F_{11} + F_9$$

Ecc. 4.20

De acuerdo a lo comentado en la sección 3.4.5, la masa de alginato está dada por:

$$AgNa_{12} = AgNa_{10} = 2 * B_9$$

Ecc. 4.21

Y la masa de almidón:

$$Am_{12} = Am_{11} = 10 * AgNa_{10}$$

Ecc. 4.22

Considerando los respectivos contenidos de humedad de cada compuesto, se obtienen las corrientes F_{10} y F_{11} .

Para lograr una concentración de 10^{10} ufc/ml o 17,3 g/L de biomasa (ver sección 3.4.5) en la mezcla a extrusar, es necesario saber el volumen final de la mezcla.

El volumen final de mezcla se obtiene con la Ecc. 4.23

$$V_{mezcla} = \frac{B_{12}}{C_{B_{12}}}$$

Ecc. 4.23

Luego, la masa total de mezcla (F_{12}), se obtiene al multiplicar por la densidad de la mezcla final, la cual se estimó en 1,2 [kg/L] (Chan, et al., 2011).

Luego de obtener la corriente F_{12} , es posible calcular F_9 mediante la Ecc. 4.24:

$$F_9 = F_{12} - F_{11} - F_{10}$$

Ecc. 4.24

En la Tabla 4.21 se muestra la composición de las corrientes de esta etapa.

Tabla 4.21 Resultados balance de masa de la etapa de mezclado para un lote

Flujo	B [kg]	AgNa [kg]	Am [kg]	W [kg]	Total [kg]
F_9	1,29	-	-	53,62	54,90
F_{10}	-	2,57	-	0,45	3,02
F_{11}	-	-	25,71	5,64	31,35
F_{12}	1,29	2,57	25,71	59,71	89,28

b) Balance de energía

Según lo indicado en la sección 3.4.5, tanto el almidón como el alginato de sodio no requieren de calentamiento previo para ser disueltos en el agua y su disolución se logra agregándolos lentamente con agitación continua. Es por esta razón, que esta etapa no considera balance de energía.

4.5 ENCAPSULACIÓN

a) Balance de materia

Esta etapa consiste en hacer pasar el flujo F_{12} a través de una boquilla, el cuál es cortado en segmentos de forma uniforme con el uso de una rueda de corte rotativa con una frecuencia determinada, formando las pre-cápsulas (ver Fig. 4.9). Éstas pasan por un túnel de pre-gelificación donde son rociadas por la solución de CaCl_2 (F_{14}) recirculada del estanque E-1 para disminuir la deformación de las cápsulas con el impacto al caer en la solución. El estanque de gelificación (E-1) es alimentado con una solución de CaCl_2 (F_{20}) al 1,5% p/v, en donde se produce la reacción de entrecruzamiento. Esta solución es recuperada del lote anterior pero previamente acondicionada en el estanque de recepción (E-2) por las corrientes F_{19} y F_{18} (ver Fig. 4.9).

La corriente de salida de esta etapa, es la corriente F_{16} la cual se compone de dos fases: (a) la solución de CaCl_2 remanente junto con el cloruro de sodio (NaCl) formado producto de la reacción, y (b) las cápsulas suspendidas en la solución.

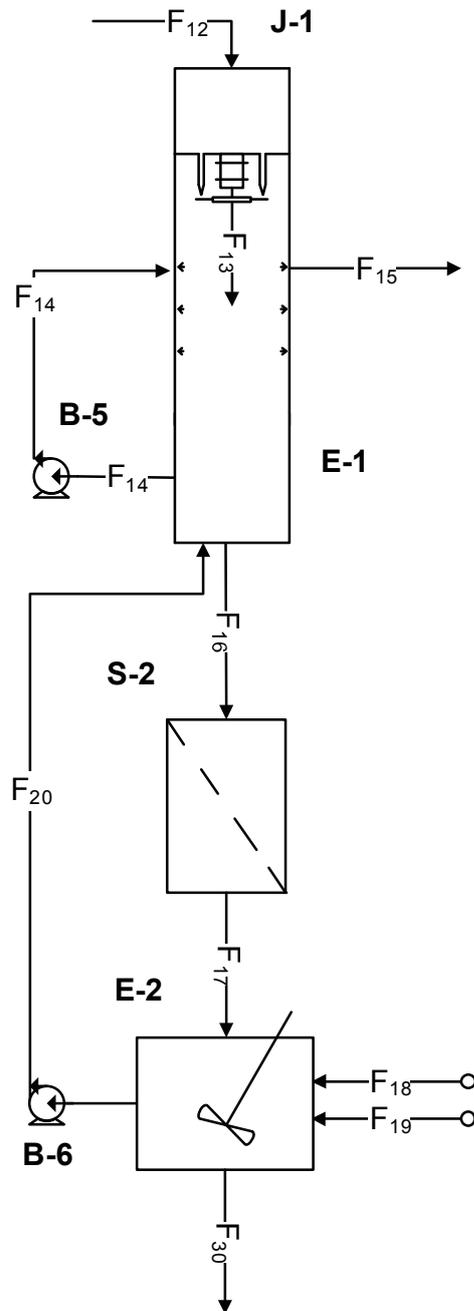


Fig. 4.9 Diagrama equipo encapsulador (J-1, E-1, S-2, E-2)

Al realizar el corte de las cápsulas, se calcula una pérdida del 4% del volumen total de mezcla debido a que el cuchillo, al realizar el corte, desplaza cierto volumen (Prüsse, Jahnz, Wittlich, & Vorlop, 2003), quedando pegado en los bordes del equipo. Este producto acumulado, debe ser removido y recirculado nuevamente a la entrada del extrusor para evitar la pérdida de material y disminuir la generación de residuos. Sin embargo, se considera que en el global del

sistema, se pierde un 10% de este producto acumulado, cuando se realiza la limpieza del equipo, lo que corresponde a la corriente F_{15} .

Por otro lado, la corriente F_{13} estaría determinada por la Ecc. 4.25:

$$F_{13} = (100\% - 4\%) * F_{12}$$

Ecc. 4.25

El balance general a la etapa de entrecruzamiento estaría determinado por la Ecc. 4.26:

$$F_{16} = F_{13} + F_{20}$$

Ecc. 4.26

Para el primer lote se tiene la siguiente relación:

$$F_{20} = F_{18} + F_{19}$$

Ecc. 4.27

y para los lotes siguientes se tiene:

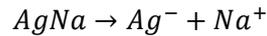
$$F'_{20} = F'_{18} + F'_{19} + F_{17}$$

Ecc. 4.28

Donde F'_{18} y F'_{19} es la cantidad de agua y CaCl_2 necesarios para lograr la misma concentración de CaCl_2 que había en F_{20} para el primer lote. Para obtener la corriente F_{30} , se calcula la concentración de CaCl_2 y de NaCl que resulta en el décimo lote, lo cual corresponde a la corriente F_{17} luego del décimo lote sin ser acondicionada.

En esta etapa, es necesario realizar un balance estequiométrico a la siguiente sucesión de reacciones químicas:

Disociación de la sal de alginato:



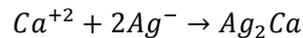
Ecc. 4.29

Disociación del cloruro de calcio



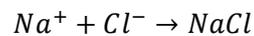
Ecc. 4.30

Reacción de gelificación con entre el calcio y el alginato



Ecc. 4.31

Formación de NaCl con el sodio y el cloro restantes



Ecc. 4.32

El entrecruzamiento es una reacción iónica en donde el Ca^{+2} desplaza al Na^{+} como se describe con más detalle en la siguiente reacción:



Ecc. 4.33

Donde

$C_6H_7O_6Na$ es AgNa

y $C_{12}H_{14}CaO_{12}$ es Ag_2Ca

(Hae-Sung, 1990). La transferencia de masa de esta reacción, se rige por el fenómeno de difusión. Existen modelos que describen la entrada de Ca^{+2} y la salida del Na^{+} (Hae-Sung, 1990), sin embargo, en una evaluación a escala industrial, regirse por el modelo de difusión para obtener el balance de masa no es influyente. En este caso, se consideró la pérdida en masa de Na^{+} y la ganancia en masa de Ca^{+2} por mol que reacciona de forma estequiométrica asumiendo un 100% de reacción. Para determinar la masa de calcio, se obtuvieron los moles de alginato de acuerdo a la Ecc. 4.34

$$m_{Ag} = \frac{AgNa}{PM_{AgNa}}$$

Ecc. 4.34

m_{Ag} : moles de alginato

Considerando un 75% molar de ácido glicurónico (Draget, Smidsrod, & Skjak-Braek, 2005) para un alginato de alta densidad, la masa de Ca^{+2} está dada por:

$$Ca^{+2} = \frac{75\% * m_{Ag}}{2} * PM_{Ca^{+2}}$$

Ecc. 4.35

Debido a que el alginato de sodio es una sal soluble en agua, se disocia completamente, por lo que la masa de Na^+ que se libera es:

$$Na^+ = m_{Ag} * PM_{Na^+}$$

Ecc. 4.36

Luego, la masa de alginato de calcio final en las cápsulas se obtiene de acuerdo a la Ecc. 4.37

$$AgCa_{16} = m_{Ag} * PM_{Ag} - Na^+ + Ca^{+2}$$

Ecc. 4.37

Se asume que los moles de ácido manurónico forman parte de la cápsula, entrelazándose entre ellos mediante una molécula de oxígeno asociándose al almidón mediante puentes de hidrógeno (ver Fig. 3.3)

Como se comentó anteriormente, la corriente F_{16} , se compone de dos fases:

$$F_{16a}: W_{E16} + AgCa_{16} + Am_{16} + B_{16} + P_{16}$$

$$F_{16b}: W_{16} + CaCl_{2,16} + Ca_{16}^{+2} + NaCl_{16}$$

Donde F_{16a} representa las cápsulas suspendidas en la solución y F_{16b} la solución remanente.

Se asume una eficiencia de encapsulación de un 100% en masa (Chan, et al., 2011; Schoebitz, Simonin, & Poncelet, 2012), por lo que la masa de almidón (Am_{16}), de biomasa (B_{16}) y de agua (W_{E16}) dentro de la cápsula es equivalente a la de la corriente F_{13} . Para diferenciar el agua encapsulada del agua que compone la solución se utilizó el subíndice E.

Para obtener la corriente F_{18} y F_{19} en el primer lote, se estimó que el volumen mínimo para sumergir las cápsulas corresponde al doble del volumen que utilizarían las cápsulas, si tuviesen forma cúbica con arista igual al diámetro de las cápsulas:

$$V_{20} = 2 * (D_{cápsulas})^3 * n^{\circ}_{cápsulas}$$

Ecc. 4.38

Debido a que la cinética de entrecruzamiento depende de la concentración de $CaCl_2$ presente en la solución (C_{CaCl_2}) (ver sección 3.4.5), es necesario respetar este parámetro, por lo que la masa de $CaCl_2$ necesaria se obtiene por la Ecc. 4.39 :

$$CaCl_{219} = \frac{C_{CaCl_2}}{V_{20}}$$

Ecc. 4.39

La masa de agua (F_{18}) para el primer lote se obtiene multiplicando el volumen de solución de $CaCl_2$ por la densidad (1 kg/L) y restando la masa de $CaCl_2$.

Los resultados del balance a esta etapa se encuentran en la Tabla 4.22

Tabla 4.22 Resultados balance de masa de la etapa de extrusión para un lote (valores en [kg]).

Flujo	B	AgNa	Ag ₂ Ca	Am	W	W _E (*)	CaCl ₂ +Ca ⁺²	NaCl	Total
F₁₂	1,29	2,57	-	25,71	59,71	-	-	-	89,28
F₁₃	1,23	2,25	-	24,68	57,32	-	-	-	85,49
F₁₄	-	-	-	-	207,1	-	3,15	-	210,26
F₁₅	0,005	0,03	-	0,1	0,24	-	-	-	0,38

Flujo	B	AgNa	Ag ₂ Ca	Am	W	W _E (*)	CaCl ₂ +Ca ⁺²	NaCl	Total
F ₁₆	1,23	-	2,16	24,68	207,10	57,32	2,58	0,67	295,75
F ₁₈	-	-	-	-	207,10	-	-	-	207,10
F ₁₉	-	-	-	-	-	-	3,15	-	3,15
F ₂₀	-	-	-	-	207,10	-	3,15	-	210,26
F ₃₀	-	-	-	-	144,96	-	1,82	1,51	148,29

(*) W_E: agua encapsulada

Con respecto a la solución de CaCl₂, se ha determinado que la cantidad necesaria a agregar de solución fresca, se vuelve relativamente constante luego del lote n° 10 (ver Fig. 4.10). De acuerdo a esto, se estima que el aumento en el volumen de la solución debido a la acumulación de NaCl no es un problema. Sin embargo, para evitar su contaminación, es necesario renovar la solución luego de cierto número de lotes. Se estima que la purga de la solución de CaCl₂ debe realizarse cada 10 lotes, alimentando el siguiente lote con una solución totalmente fresca.

El volumen total a purgar es de 211,76 L con una masa de NaCl de 1,5 kg y de CaCl₂ de 3,17 kg, cuyo tratamiento como residuo se abordará en la sección 4.10.

El perfil de acumulación de NaCl y el aumento de volumen de solución de CaCl₂ se muestran en la Fig. 4.10.

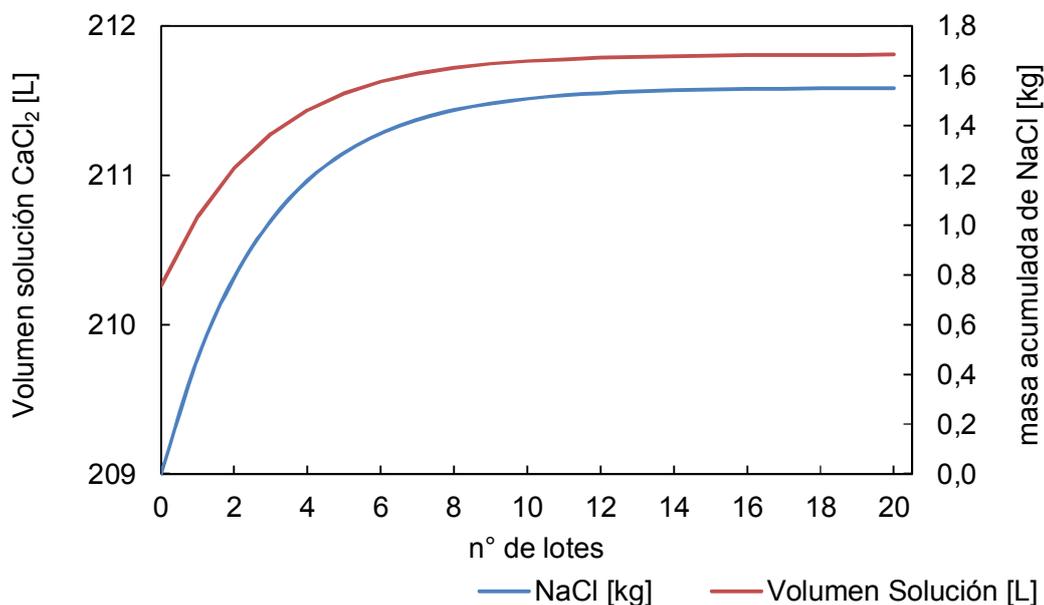


Fig. 4.10 Perfil de acumulación de la solución de CaCl₂ y NaCl

b) Balance de energía

Para el balance de energía de la etapa de encapsulación, se desprecia el calor generado por el equipo, ya que en este caso no es necesario precalentar la mezcla antes de ser encapsulada. Se considera que en el transporte desde el mezclador hasta el encapsulador disminuye en 2°C la temperatura de la mezcla.

La disolución de CaCl₂ en agua, libera energía y puede aumentar considerablemente la temperatura de la solución cuando se encuentra a altas concentraciones (Occidental Chemical Chile Limitada, 2007). En este caso, una solución al 1,5% no provoca cambios significativos de temperatura, y es por esto que no se requiere realizar el balance de energía a esta etapa.

4.6 SEPARACIÓN MEDIANTE FILTRACIÓN

a) Balance de materia

Esta etapa consiste en la separación de las cápsulas obtenidas (F_{23}) y la recuperación del CaCl_2 remanente (F_{17}), mediante el uso de una malla de 0,5 mm de abertura a modo de filtro o colador.

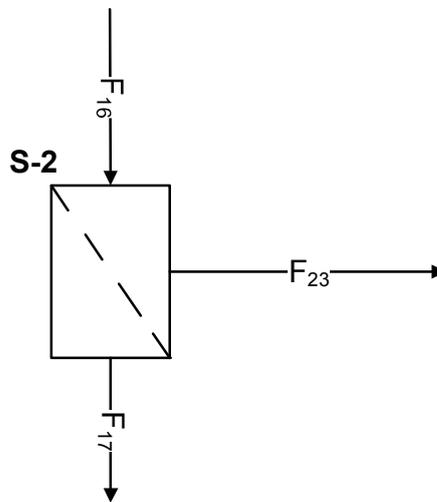


Fig. 4.11 Diagrama Filtro (S-2)

El balance general de esta etapa está dado por la Ecc. 4.40:

$$F_{16} = F_{23a} + F_{17}$$

Ecc. 4.40

Se asume que un 30% de la solución de CaCl_2 remanente proveniente de la corriente F_{16} , pasa a la corriente F_{23a} , la cual es removida en la etapa de lavado.

La corriente F_{23a} representa las cápsulas luego de la filtración, y la corriente F_{23b} representa las cápsulas luego del lavado. Ambos procesos ocurren en el mismo equipo pero en momentos diferentes siendo la etapa de filtrado anterior a la etapa de lavado. La corriente F_{23b} es la que entra al secador.

Debido al tamaño de las cápsulas, se asume que no hay problemas de transferencia de masa en el filtro.

Los resultados de la etapa de filtrado se encuentran en la Tabla 4.23.

Tabla 4.23 Resultados balance de masa de la etapa de separación por filtración para un lote (valores en [kg]).

Flujo	B	Ag ₂ Ca	Am	W	W _E [kg]	CaCl ₂ +Ca ⁺²	NaCl	Total
F ₁₆	1,23	2,16	24,68	207,10	57,32	2,58	0,67	295,75
F ₁₇	-	-	-	144,97	-	1,81	0,47	147,24
F _{23a}	1,23	2,16	24,68	62,13	57,32	0,77	0,20	148,51

b) Balance de energía

Esta etapa no considera balance de energía.

4.7 LAVADO DE LAS CÁPSULAS

a) Balance de materia

Esta etapa consiste en el enjuague de las cápsulas obtenidas (F_{23a}) con una corriente de agua limpia (F₂₁) para la eliminación del CaCl₂, Ca⁺² y NaCl remanente (Ivanova, Teunou, & Poncelet, 2006). Se asume que se remueve el 100% de todos los compuestos no deseados y un 95% del agua libre.

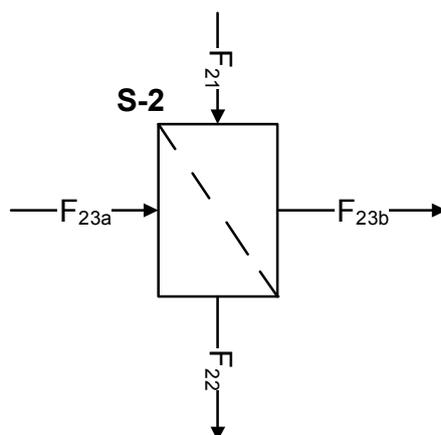


Fig. 4.12 Diagrama del equipo de lavado (S-2)

El balance general a esta etapa queda determinado por la Ecc. 4.41

$$F_{21} + F_{23a} = F_{22} + F_{23b}$$

Ecc. 4.41

Se estima que para el lavado de las cápsulas, se requiere la misma cantidad de agua que la contenida en la corriente F_{23} , siendo suficiente para remover el CaCl_2 y los otros residuos remanentes. Luego, se tiene que $W_{21} = W_{23a}$.

En la Tabla 4.24 se muestran los resultados del balance a esta etapa.

Tabla 4.24 Resultados balance de masa de la etapa de lavado para un lote (valores en [kg]).

Flujo	B	Ag ₂ Ca	Am	W	W _E	CaCl ₂ +Ca ⁺²	NaCl	Total
F_{23a}	1,23	2,16	24,68	62,13	57,32	0,77	0,20	148,51
F_{23b}	1,23	2,16	24,68	3,11	57,32	-	-	88,51
F₂₁	-	-	-	62,13	-	-	-	62,13
F₂₂	-	-	-	121,16	-	0,77	0,20	122,13

b) Balance de energía

Esta etapa no considera balance de energía.

4.8 SECADO

a) Balance de materia

Esta etapa consiste secar las cápsulas lavadas en un secador rotatorio de intercambio directo con el objetivo de remover el agua en exceso hasta un contenido de humedad del 10% en base seca (Iavnova, Teunou, & Poncelet, 2006).

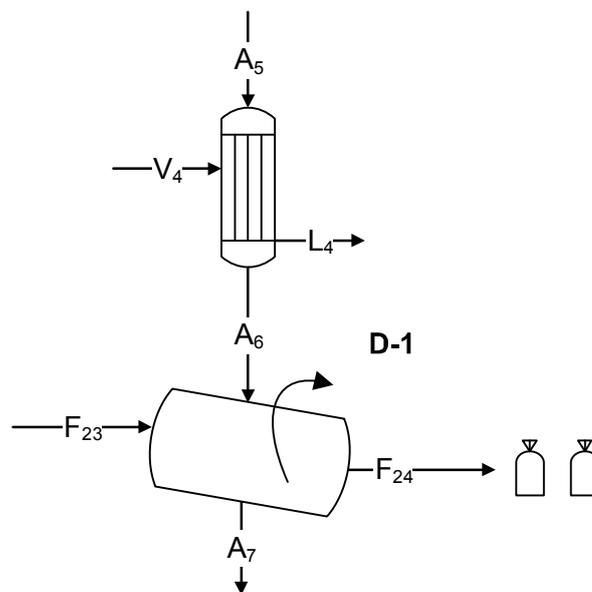


Fig. 4.13 Diagrama del Equipo de Secado (D-1)

Del balance realizado a la etapa anterior, se obtiene que las cápsulas entran al secador con un contenido de humedad en base seca de 215% (11% W y 204%W_E). Sin embargo, este contenido de humedad calculado, no considera la presencia de almidón en las cápsulas, el

cual, posiblemente causa el hinchamiento de éstas en el momento de la gelificación⁶ Dado que se desconoce la cantidad de agua adsorbida, se estimó que las cápsulas podrían aumentar su contenido de humedad como máximo, en un 5% en base húmeda.

Para secar las cápsulas se utiliza una corriente de aire (A_5), la cual es calentada con una corriente de vapor saturado (V_4) en un intercambiador de tubo y carcaza.

Para obtener la cantidad de aire necesario que removerá el agua de las cápsulas, se realiza el siguiente balance de acuerdo a la Ecc. 4.42:

$$M_s * (X_{23} - X_{24}) = G_{s_{26}} * (Y_{A7} - Y_{A6})$$

Ecc. 4.42

Donde:

Ms: masa de cápsulas en base seca [g]

X: masa de agua por masa seca [g/g]

Gs: masa de aire seco [g]

Y: masa de agua por masa de aire seco [g/g]

De acuerdo a lo comentado anteriormente, se considera que un 30% en exceso de aire es suficiente para soportar un aumento del 5% de humedad en las cápsulas.

El contenido de humedad y las condiciones del aire de secado se describen en la sección 5.9.

La cantidad de vapor requerida para calentar el aire se obtiene mediante la siguiente ecuación:

⁶ Comunicación directa con Dr. Mauricio Schoebitz, *Dr. en Ingeniería de Procesos Agroalimentarios, Universidad de Nantes, Francia*, noviembre de 2014.

$$V_4 = \frac{Q_{IC}}{\lambda}$$

Ecc. 4.43

Donde:

V_4 : es la masa total de vapor necesaria para calentar el aire requerido para secar un lote de cápsulas [kg]

Q_{IC} : calor necesario para calentar el aire obtenido del balance de energía (ver sección b)b).

λ : calor latente de vaporización del agua a la presión de operación del intercambiador de calor, 2202 a 2 bar [kJ/kg]

Los resultados del balance al secador se encuentran en la Tabla 4.25

Tabla 4.25 Resultados balance de masa de la etapa de secado para un lote en [kg]

Flujo	B	Ag ₂ Ca	Am	W	W _E	G	Total
F_{23b}	1,23	2,16	24,68	3,11	57,32	-	88,51
F₂₄	1,23	2,16	24,68	-	2,81	-	30,89
A₅	-	-	-	74,18	-	10.597,64	10.671,82
A₆	-	-	-	74,18	-	10.597,64	10.671,82
A₇	-	-	-	131,81	-	10.597,64	10.729,44
V₄	-	-	-	135,51	-	-	135,51
L₄	-	-	-	135,51	-	-	135,51

*la cantidad de aire calculada considera un 30% en exceso.

b) Balance de energía

Dada las condiciones de entrada y salida de las corrientes presentadas en la sección 5.9, se obtuvo el calor necesario para remover el agua contenida en las cápsulas de acuerdo al siguiente balance:

$$Q_{A5} + Q_{IC} + Q_{23} = Q_{24} + Q_{A7} + Q_p$$

El cual se puede expresar acorde a la Ecc. 4.44:

$$G_{SA5} * h_{A5} + Q_{IC} + M_{S23} * Cp_{23} * (T_{23} - T_{ref}) = G_{SA7} * h_{A7} + M_{S24} * Cp_{24} * (T_{24} - T_{ref}) + Q_p$$

Ecc. 4.44

Donde:

$M_{S23} = M_{S24}$: masa de cápsulas en base seca de la corriente de entrada y salida del secador[g]

$G_{SA5} = G_{SA7}$: masa de aire seco a la entrada del intercambiador de calor y a la salida del secador [g]

Q_{IC} calor requerido para calentar la masa de aire en el intercambiador de calor [kJ]

Cp_{23} , Cp_{24} : Capacidad calorífica de las cápsulas en la corriente de entrada y de salida del secador

T_{23} , T_{24} : temperatura de entrada y de salida de las cápsulas.

T_{ref} : temperatura de referencia; 0 [°C]

h_{A5} , h_{A7} : entalpía específica del aire [kJ/kg aire seco]

Q_p : calor perdido por las paredes del secador, estimado en 10% del calor total [kJ]

La temperatura de entrada de las cápsulas se estima en 15°C, considerando que luego del filtrado y lavado éstas alcanzan la temperatura ambiente. La temperatura de salida de las cápsulas se asume igual a la temperatura de salida de aire luego del secado, y dadas las condiciones del aire indicadas en la sección 5.9 se estima en 23°C. Por último, la temperatura de entrada al secador se define en 40°C como se indica en la sección 3.4.7, debido a que una mayor temperatura podría dañar las cápsulas.

Los valores resultantes del balance de energía se presentan en la Tabla 4.26.

Tabla 4.26 Resultados balance de energía de la etapa de secado para un lote

Flujo	Ms [kg]	Gs [kg]	Cp [kJ/kg °C]	h [kJ/kg aire seco]	T [°C]	Q [kJ]
F₂₃	28,08	-	13,06	-	15	5.502,43
F₂₄	28,08	-	2,03	-	23	1.310,91
A₅	-	10.597,64	-	32,85	40	348.178,98
A₇	-	10.597,64	-	58,85	23	623.664,11
Qp	-	-	-	-	-	27.129,36
QIC	-	-	-	-	-	298.422,97

4.9 VIABILIDAD CELULAR

Como se indicó en las secciones 4.3 y 4.5, existe una pérdida del 5% de biomasa en la etapa de centrifugación y un 4% de biomasa queda retenida el proceso de encapsulación, por lo que en términos de masa celular el rendimiento es de un 91,2%.

En algunos de los estudios revisados, se indica que en el proceso de extrusión existe pérdida de viabilidad celular (Amorós, 2013; Iavnova, Teunou, & Poncelet, 2006), y en otros se indica que en el proceso de encapsulación se recupera el 100% de las células viables (Chan, et al., 2011). Esta diferencia seguramente se debe a que en cada caso, las condiciones de trabajo son distintas y el tipo de bacteria a encapsular también. A modo de estimación, se consideró una pérdida del 5% del total de células viables, ya que no se debe obviar la muerte celular producto del esfuerzo mecánico u otras barreras a las cuales se pueden ver enfrentadas las células en la etapa de encapsulación.

Luego, en la etapa de secado, se estima que el rendimiento de células viables es de aproximadamente un 40% (Hernández & López, 2009; Iavnova, Teunou, & Poncelet, 2006).

Finalmente, el rendimiento global del proceso es de un 34,7%. Dado esto, se obtiene el valor aproximado de ufc/g de producto final de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{g \text{ de producto final}} = \frac{34,7\% * UFC_{iniciales}}{F_{24}}$$

Ecc. 4.45

El producto elaborado contiene aproximadamente $8,8 \cdot 10^9$ ufc/g, considerando que el total de células obtenidas luego de la fermentación son viables y que la pérdida de viabilidad se debe principalmente a la etapa de secado. La corriente F_{24} en base húmeda es de 30,8 kg de producto.

Por último, en la Tabla 4.27 se presentan las características finales de las cápsulas, cuyo diámetro es de aproximadamente 1 [mm] y cuyo peso es de 2,3 [mg].

Tabla 4.27 Composición cápsula final después del secado

componente	%p/p
biomasa total	4%
biomasa viable	2%
alginato	7%
almidón	80%
agua	9%

4.10 TRATAMIENTO DE RESIDUOS

Los principales residuos generados en un lote provienen principalmente de la corriente de permeado de la centrífuga (F_8), de los residuos provenientes del encapsulador (F_{15}) y del estanque de gelificación (F_{30}), que en este caso se ha considerado para simular el peor escenario. Además se considera el agua de lavado de los equipos, asumiendo que la concentración de productos remanentes es despreciable.

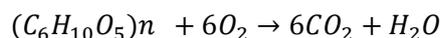
Las corrientes que se deben descartar se presentan en la Tabla 4.28.

Tabla 4.28 Residuos generados en un lote de producción
valores en [kg]

Flujo	B	W	AgNa	Am	CaCl ₂ + Ca ⁺²	NaCl	Total
F₈	0,07	170,03	-	-	-	-	170,10
F₁₅	0,0050	0,24	0,03	0,10	-	-	0,38
F₃₀	-	14,50	-	-	0,18	0,15	14,83
Agua de Lavado	-	1.184,12	-	-	-	-	1.184,12
Total	0,07	1.368,88	0,03	0,10	0,18	0,15	1.369,43

Para la facilitar la estimación de la carga orgánica de la corriente de residuos, se asume que éstos son descartados en un mismo momento, y se considera que el almidón y la biomasa son los que más influyen en el valor de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅).

Para obtener el valor de la DBO₅ teórica, se calcula en primera instancia, el valor de la demanda química de oxígeno (DQO), como se muestra a continuación.



Ecc. 4.46

Ya que no se sabe con exactitud el valor del radical (n) se considera como mínimo n = 1.

Luego, se tiene la siguiente relación:

$$\frac{192g \text{ Oxígeno}}{162g \text{ Almidón}} = 1,185$$

Luego, el valor de la demanda química de oxígeno corresponde a 1,185 veces el valor de la concentración de almidón en la corriente de residuos.

Así mismo, para la estimación de la DQO de la biomasa se requiere la fórmula molecular de la bacteria. Dado que no se tiene la fórmula molecular exacta de *Azotobacter spp.* o de *Azospirillum spp.*, se estima una fórmula molecular básica, acorde a la composición promedio de una bacteria (Acevedo, Gentina, & Illanes, 2002).

Luego se plantea el siguiente balance,



Ecc. 4.47

obteniendo la siguiente relación

$$\frac{672 \text{ g Oxígeno}}{456 \text{ g Biomasa}} = 1,473$$

Debido a que la corriente de residuo se compone de material fácilmente biodegradable, se considera una relación $DBO_5/DQO = 0,6$.

Para el cálculo de las concentraciones se considera una densidad de 1,05 kg/L, siendo el volumen del residuo de 1.304,21 litros. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

Tabla 4.29 Caracterización residuos generados en un lote

Parámetro	Unidad	B	Am	Total
Concentración	mg/L	55,97	78,97	-
DQO	mg O ₂ /L	82,28	93,59	175,86
DBO ₅	mg O ₂ /L	49,37	56,15	105,52
SST	mg/L	55,97	78,97	159,48

Dado que la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) y la concentración de sólidos suspendidos cumplen con el Decreto 609, Tabla N° 4 de la Norma Chilena, los residuos generados pueden ser descartados a una red de alcantarillado que cuente con planta de tratamiento.

CAPÍTULO 5

DISEÑO, ESTIMACIÓN Y SELECCIÓN DE EQUIPOS

5.1 ESTANQUE DE MEZCLA

5.1.1 Diseño de equipos M1 y M1'

Para determinar las dimensiones del tanque de mezcla se debe considerar un volumen 250L, los que considerando un factor de seguridad del 20% quedan en 300L. Para el diseño se siguen las mismas razones mencionadas en Tabla 5.5, teniendo en cuenta que las relaciones para impulsores tipo Rushton y hélice marina son las mismas (Doran, 2013).

Tabla 5.1 Valores de diseño y selección de equipo mezclador M1 y M1'

Parámetro	Valor calculado	Valor seleccionado	Unidad
V	250	300	[L]
T	620	523	[mm]
H	827	1395	[mm]
D	207	262	[mm]
C	205	173	[mm]
J	62	52	[mm]
i	1	1	-
W _B	41	52	[mm]

5.1.2 Potencia de agitación

Para determinar el régimen del fluido dentro del mezclador es necesario utilizar la Ecc. 5.2, considerando los valores de la siguiente tabla:

Tabla 5.2 Datos para el cálculo de la potencia requerida en el agitador

Parámetro	Valor	Unidad
ρ densidad fluido	1000	[kg/m ³]
μ	0,001	[kg/ms]
N	1,67	[rps]
Re	$1,14 \cdot 10^4$	-

El valor de la velocidad de agitación dentro del mezclador se definió como 100 rpm, de manera de asegurar el correcto mezclado del medio de cultivo. El número de Reynolds demuestra un régimen turbulento. Para el cálculo de potencia de agitación se utiliza la Ecc. 5.3, considerando N_P típico de turbinas de hélice marina (Doran, 2013).

Tabla 5.3 Resumen de potencias requeridas en el agitador

Parámetro	Valor	Unidad
N_p	0,35	-
P_0	1,99	[W]
P_{ef}	2,21	[W]
P_T	2,65	[W]

5.2 FERMENTACIÓN

5.2.1 Diseño de fermentadores

El diseño de los fermentadores se realiza en base a un reactor cilíndrico de tanque agitado, cuyas relaciones geométricas están recomendadas para un impulsor tipo turbina Rushton de 6 paletas estándar. Los fermentadores de propagación R1 y R2 se diseñan para una capacidad de 2,25 y 22,5 L respectivamente, y el fermentador principal de 250L, esto considerando inicialmente un volumen total de 3, 30 y 300 L y volumen útil del 75%.

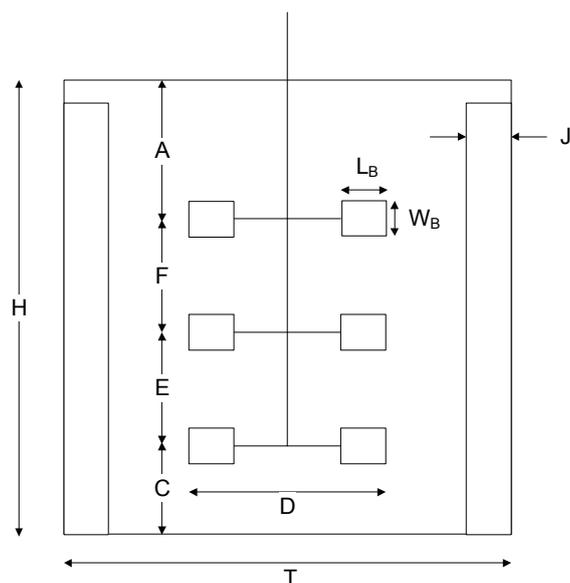


Fig. 5.1 Nomenclatura en el fermentador

A continuación se presenta la descripción detallada de la simbología referente a la Fig. 5.1 y los valores típicos para cada parámetro nombrado, para finalmente escoger aquel que mejor se adecua a los requerimientos del proceso.

Tabla 5.4 Nomenclatura referente a la Fig. 5.1

Descripción	Simbología
Altura a la que se instala el primer impulsor	A
Distancia vertical entre el ultimo impulsor y la base	C
Diámetro del impulsor	D
Distancia entre impulsores	E
Distancia entre impulsores	F
Altura del fermentador	H
Ancho del baffle o deflector	J
Largo de la paleta del impulsor	L_B
Diámetro del fermentador	T
Ancho de la paleta del impulsor	W_B
Número de rotores	i

Tabla 5.5 Razones recomendadas para el diseño de fermentador con impulsor tipo turbina Rushton de 6 paletas estándar

Razón	Valor referencia (Acevedo, Gentina, & Illanes , 2002)	Valor referencia (Doran, 2013)	Valor escogido
H _L /T	1 – 3	1	2
D/T	0,3 – 0,6	0,3	0,5
A/D	0,5 – 3	1	1
E/D, F/D	1 – 2	-	1
J/T	0,08 – 0,1	0,1	0,1
H _L /H	0,7 – 0,8	0,7 – 0,8	0,75
C/T	-	0,3	0,33
L _B /D	-	0,25	0,25
W _B /D	-	0,2	0,2

Para determinar las dimensiones de los fermentadores se utiliza la ecuación de volumen que se describe a continuación, de manera de despejar el diámetro T, para luego relacionarlo con las semejanzas escogidas de la Tabla 5.5

$$V = \pi \left(\frac{T}{2} \right)^2 H$$

Ecc. 5.1

Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6 Dimensiones de equipos R1, R2 y R3

Parámetro	R1	R2	R3	Unidades
V	3	30	300	[L]
T	113	243	523	[mm]
H	301	648	1395	[mm]
A	56	121	262	[mm]
D	56	121	262	[mm]
E	56	121	262	[mm]
F	56	121	262	[mm]
C	37	80	173	[mm]

Parámetro	R1	R2	R3	Unidades
J	11	24	52	[mm]
W _B	11	24	52	[mm]
L _B	14	30	65	[mm]
i	2	3	3	-

Considerando que debe existir un factor de seguridad del 20% en el dimensionamiento de los equipos, se recalculan las dimensiones de cada reactor, así como también los volúmenes totales reales. Los valores de la Tabla 5.7 son los seleccionados de acuerdo a los criterios ya descritos.

Tabla 5.7 Dimensiones seleccionadas para equipos R1, R2 y R3

Parámetro	R1	R2	R3	Unidades
V	3,6	36	360	[L]
T	120	260	555	[mm]
H	320	700	1480	[mm]
A	60	129	278	[mm]
D	60	129	278	[mm]
E	60	129	278	[mm]
F	60	129	278	[mm]
C	40	85	183	[mm]
J	12	26	56	[mm]
W _B	12	26	56	[mm]
L _B	15	32	70	[mm]
i	2	3	3	-

5.2.2 Potencia de agitación

El régimen de flujo del medio de cultivo dentro de cada fermentador se determina mediante la ecuación del número de Reynolds.

$$Re = \frac{\rho D^2 N}{\mu}$$

Ecc. 5.2

Donde:

ρ : densidad del fluido, kg/m³

D: diámetro del impulsor m

N: velocidad de agitación 1/s

μ : viscosidad del fluido kg/m·s

Tabla 5.8 Valores de número de Reynold

	R1	R2	R3
Re	$9 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$

De esta manera el régimen del fluido de todos los reactores es mayor a 10^3 , por lo que se asumen régimen turbulento. Para determinar la potencia necesaria para la agitación de los reactores, se definen las siguientes ecuaciones:

$$P_0 = N_p N^3 D^5 \rho$$

Ecc. 5.3

$$P_{g0} = 0,72 \left(\frac{P_0^2 N D^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,45}$$

Ecc. 5.4

$$P_{ef} = P_{g0} \cdot \eta$$

$$P_{gi} = P_{ef} \cdot i$$

$$P_{gT} = P_{gi} \cdot f$$

Donde:

N_p : número de potencia del impulsor para fluidos no aireados 5-6 régimen turbulento

P_0 : potencia no aireada de agitación para un impulsor

P_{g0} : potencia gaseada de agitación para un impulsor

η : eficiencia del motor, 90%

P_{ef} : potencia gaseada de agitación real para un impulsor

P_{gi} : potencia gaseada de agitación real para i impulsores

f : factor de seguridad, 20%

P_{gT} : potencia gaseada total

Mediante estas ecuaciones es posible determinar la potencia necesaria para agitar los fermentadores.

Tabla 5.9 Resumen potencia de agitación en reactores

Parámetro	R1	R2	R3	Unidades
P_0	0,075	3,47	262	[W]
P_{g0}	0,037	1,62	134	[W]
P_{ef}	0,042	1,80	149	[W]
P_{gi}	0,083	5,41	447	[W]
P_{gT}	0,100	6,49	536	[W]

5.3 SEPARADOR CENTRÍFUGO (S-1)

En el diseño de un separador centrífugo, es posible suponer que se cumple la ley de Stokes para las suspensiones diluidas, características de los caldos biológicos (Tejeda, Montesinos, & Guzmán, 1995). De acuerdo a esta suposición, se obtiene la Ecc. 5.5, la cual describe la relación entre el flujo de entrada a la centrífuga, la velocidad terminal de las partículas y el área equivalente necesaria para estimar los requerimientos de la centrífuga a seleccionar.

$$F = 2v_g \Sigma$$

Ecc. 5.5

Donde:

F : flujo de operación de la centrífuga; estimado en $1,4 \cdot 10^{-4}$ [m³/s] de acuerdo al volumen a centrifugar (ver sección 4.3)

v_g : velocidad terminal en un campo gravitacional en [m/s]

Σ : factor de diseño, que corresponde al área equivalente de un sedimentador de altura h que realiza igual trabajo que la centrífuga [m²]

A su vez, la velocidad terminal en un campo gravitacional se determina por la Ecc. 5.6

$$v_g = \frac{d_p^2(\rho_p - \rho_l)g}{18\mu}$$

Ecc. 5.6

Donde:

g : aceleración de gravedad; 9,8 [m/s²]

d_p : diámetro de la partícula, en este caso la célula de aproximadamente; $1,44 \cdot 10^{-6}$ [m]

ρ_p : densidad de la partícula; 1100 [kg/m³]

ρ_l : densidad del fluido; 1050 [kg/m³]

μ : viscosidad del medio; estimada en $1 \cdot 10^{-3}$ [Pa*s]

En la sección 3.4.4, se determinó que el separador centrífugo más adecuado para la concentración de biomasa era una centrífuga de discos, cuyo factor sigma se determina con la Ecc. 5.7 (ver Fig. 5.2 para mejor comprensión de la ecuación).

$$\Sigma = \left[\frac{2\pi n_d N^2}{3g \tan(\theta)} (R_0^3 - R_1^3) \right]$$

Ecc. 5.7

n_d : n° de discos

n : espacio formado entre los discos; $n'=n-1$

N : velocidad de rotación; [rpm]

θ : ángulo que forma el cono con la vertical

R_1 : Radio interno

R_2 : Radio externo

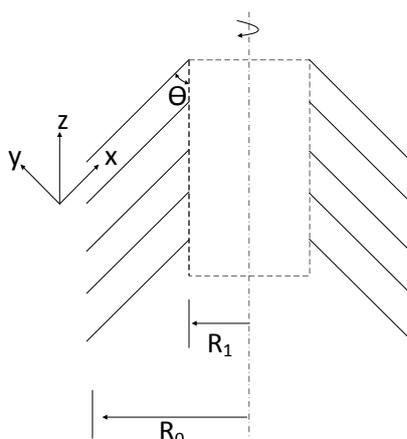


Fig. 5.2 Diagrama centrífuga de discos

Para determinar las características de la centrífuga requerida, se calcula el factor Σ (con F y v_g conocidos). De acuerdo a este factor se selecciona la centrífuga y luego se obtiene el número de discos necesarios.

Tal como se indica en secciones 3.4.4 y 4.3, el proceso de centrifugación es una etapa semi continua, es decir, la centrífuga opera de forma continua hasta procesar el volumen total que proviene de la fermentación. Para esto, es necesario estimar un caudal que sea adecuado tanto en términos de tiempo como en términos de diseño del equipo en sí. Para la escala piloto (100-300 L), existen centrífugas que operan bien entre 300 y 600 L/h. En este caso, se estimó un caudal de 500 L/h ($1,4 \cdot 10^{-4} [\text{m}^3/\text{s}]$) de acuerdo a las especificaciones de la centrífuga seleccionada.

En la Tabla 5.10 se resumen los datos del caldo de cultivo para el cálculo de la velocidad terminal y el factor sigma requerido.

Tabla 5.10 Datos para el cálculo de los parámetros de diseño de la centrífuga de discos

parámetro	valor	unidad
d_p	1,44E-06	[m]
ρ_p	1100	[kg/m ³]
ρ_f	1050	[kg/m ³]
μ	1,00E-03	[Pa*s]
g	9,8	[m/s ²]

parámetro	valor	unidad
v_g	5,66E-08	[m/s]
Q	1,4E-04	[m ³ /s]
Σ	1.226	[m ²]
Σ'	1.472	[m ²]

De acuerdo a lo señalado en la sección 4.4, se requiere concentrar la biomasa de 6 g/L a aproximadamente 25 g/L (factor de concentración de casi 4 veces de acuerdo a la Ecc. 5.8).

$$f_c = \frac{Masa_{salida}}{Volumen_{salida}} * \frac{Volumen_{entrada}}{Masa_{entrada}}$$

Ecc. 5.8

Dado que este factor es un parámetro que depende del equipo y de las características del fluido, no es posible determinarlo sin realizar pruebas. Lo más probable, es que la concentración de biomasa al final de la centrifugación sea mayor a la señalada, lo cual no es problema ya que fácilmente se puede ajustar la concentración deseada con parte del clarificado.

Las características de la centrífuga seleccionada se encuentran en la Tabla 5.11 (con mayor detalle en Tabla. D.3 del Apéndice D).

Tabla 5.11 Datos de la centrífuga seleccionada

parámetro	valor	unidad
R_0	100	[mm]
R_1	50	[mm]
n	50	-
w	7546	[rpm]
Θ	40	°
Σ	6.819	[m ²]
Q	500	[L/h]
P	1,1	[kW]

5.4 ESTANQUE DE MEZCLADO (M-1)

El estanque de mezclado se diseña de acuerdo al volumen de mezcla el cual se obtiene en la sección 4.4, considerando un volumen útil de un 75%. Las relaciones típicas para dimensionar el estanque se encuentran en la sección 5.2.1.

La turbina de paletas inclinadas es un tipo de agitador utilizado para la disolución de polvos como el alginato y el almidón (Greaves, 2014).

Las dimensiones del estanque de mezclado requeridas se encuentran en la Tabla 5.12

Tabla 5.12 Dimensiones del estanque de mezclado

parámetro	valor calculado	valor seleccionado	unidad
V_{mezcla}	74	100	[L]
volumen útil	75%	63%	-
$V_{mezclador}$	99	118	[L]
T	456	500	[mm]
H	608	600	[mm]
H_L	456	500	[mm]
D	274	300	[mm]
C	150	165	[mm]
J	46	50	[mm]
W_B	55	60	[mm]
C_J	9	10	[mm]
A	653	785	[m ²]
n° paletas	6	6	-
θ	45	45	[°]
n° baffles	4	4	-

Para la estimación de la potencia de agitación se debe tener conocimiento de las propiedades reológicas de la mezcla a la temperatura y velocidad de agitación. El alginato en solución tiene

un comportamiento no newtoniano de tipo pseudoplástico lo que significa que la viscosidad aparente se reduce con el gradiente de velocidad de deformación. Debido a que no se tienen valores de viscosidad específicos para el caso, se ha estimado una viscosidad aparente de 2,2 [Pa s] a una velocidad de esfuerzo de corte de 33 [s⁻¹], debido a la alta concentración de alginato y almidón en la mezcla (Chan, et al., 2011; Ivanova, Teunou, & Poncelet, 2006; Chan, Lee, Ravindra, & Poncelet, 2009).

Para obtener la potencia requerida por el agitador, es necesario calcular el número de Reynolds, con el cual se determina el tipo de régimen y el número de potencia asociado. Este se calcula mediante la Ecc. 5.9 (Doran, 2013).

$$Re_i = \frac{N_i D^2 \rho}{\mu_a}$$

Ecc. 5.9

Donde:

Re_i: Número de Reynolds

D: Diámetro del impulsor; [m]

N_i: Velocidad de agitación; [rps]

ρ: Densidad del fluido; [kg/m³]

μ_a: Viscosidad aparente del fluido [kg/m s]

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.13

Tabla 5.13 Datos para el cálculo del número de Reynolds

parámetro	valor	unidad	referencia
ρ _{mezcla}	1200	[kg/m ³]	(Chan, et al., 2011)
μ _{mezcla}	2,2	[kg/m s]	(Chan, et al., 2011)
N	200	[rpm]	(Ramírez, et al., 2014)
Re	164	-	

El número de Reynolds obtenido indica un régimen laminar debido a la alta viscosidad de la mezcla. La Ecc. 5.10 se utiliza para el cálculo de la potencia con régimen laminar (Doran, 2013).

$$P = k_1 \mu N_i^2 D_i^3$$

Ecc. 5.10

Donde:

k: constante de proporcionalidad para el impulsor de paletas inclinadas

P: potencia requerida para la agitación [W]

Luego, la potencia total del motor se calcula mediante la Ecc. 5.11

$$P_T = \frac{P}{\eta} n^{\circ} \text{impulsores}$$

Ecc. 5.11

Donde:

n° impulsores: número de impulsores

P_T : la potencia total del motor [W]

η : eficiencia del motor, estimada en 60%

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.14

Tabla 5.14 Datos para el cálculo de la potencia requerida en el agitador

símbolo	valor	unidad
N_p / k	50	-
P	33,155	[W]
n° impulsores	3	-
η	90%	-
P_T	110,52	[W]
P_T^{**}	165,77	[W]

* P_T considera un factor de seguridad del 50%

Con los resultados de diseño presentados anteriormente se ha seleccionado para esta operación un mezclador con un motor de potencia de 2 kW (ver Tabla. D.3 del Apéndice D). Es necesario destacar que la potencia calculada es muy baja para lo que debiese ser, ya que es una solución viscosa y se mezcla a 200 rpm. Esto debido a que se consideró la viscosidad como viscosidad aparente y se trabajó como un fluido newtoniano. De todas formas esto se consideró para la selección del equipo real.

5.5 EQUIPO ENCAPSULADOR (J-1)

Tal como se menciona en la sección 3.4.6, el equipo de encapsulación seleccionado es del tipo “jetcutter” o corte de flujo debido a que permite la encapsulación de fluidos con un amplio rango de viscosidades. El proveedor lo construye de acuerdo a los requerimientos específicos del cliente.

Si la boquilla se inclina con cierto ángulo respecto del disco de corte, es posible reducir las pérdidas hasta un 2% del volumen (Prüsse & Vorlop, The JetCutting Technology, 2004).

El ángulo de inclinación se calcula mediante la Ecc. 5.12,

$$\alpha = \arcseno\left(\frac{u_{fluido}}{u_{corte}}\right)$$

Ecc. 5.12

siendo 37 ° el ángulo que mejor se acomoda para disminuir las pérdidas.

El porcentaje de volumen de pérdida se obtiene de acuerdo a la Ecc. 5.13

$$V_{pérdida}(\%) = \frac{\pi * d_{boquilla}}{4} * d_{corte}$$

Ecc. 5.13

Los resultados presentados en la Tabla 5.15, son estimativos, debido a que el proveedor resaltó la importancia de realizar pruebas antes de adquirir el equipo, de tal forma de corroborar los tamaños y condiciones óptimas de operación.

Tabla 5.15 Datos de diseño y características del equipo encapsulador Jetcutter ®

símbolo	valor	valores típicos	unidad
d_{boquilla}	0,5	0,1 - 3	[mm]
u_{flujo}	10,42	5 - 30	[m/s]
u_{corte}	17,36	0,6*u _{flujo}	[m/s]
d_{corte}	0,1	0,08 - 0,6	[mm]
L_{corte}	5	10*d _{boquilla}	[mm]
z	48	24-120	-
d_{cápsula}	2	>0,2	[mm]
V_{pérdida}	2%	>2%	%
α	37	37 - 40	°
n		5 -7	[g/s]
n		1 - 8	
u_{rot}	9400	3000-12000	[rpm]
P	120	-	[W]

*dato entregado por el proveedor

5.6 ESTANQUE DE GELIFICACIÓN (E-1)

El estanque de gelificación se compone de un túnel de pre-gelificación con rociadores en sus paredes internas y de un estanque en el fondo donde se recolectan las cápsulas que salen del encapsulador (ver Fig. 4.9). Este estanque, no tiene las mismas relaciones de diámetro altura que un fermentador o un mezclador, ya que las cápsulas se deben distribuir ordenadamente en la solución para que todas entren en contacto con el Ca^{+2} . Si el estanque es muy profundo, algunas cápsulas quedarán sobre otras en la superficie y no se gelificarán bien. Por el contrario si el estanque es muy bajo, el volumen para sumergirlas todas es muy elevado. A modo de estimación se consideró una relación de $T/H = 1,5$ (Prüsse, Jahnz, Wittlich, & Vorlop, 2003).

Los resultados de diseño del estanque de gelificación y el túnel de pre-gelificación se encuentran en la Tabla 5.16

Tabla 5.16 Datos de diseño y características del estanque de gelificación y túnel de pre-gelificación

símbolo	valor calculado	valor seleccionado	unidad
V_{CaCl_2}	212		[L]
$V_{cápsulas}$	105		[L]
-	75%		
$V'_{estanque}$	507	518	[L]
T	989	1.000	[mm]
H	660	660	[mm]
H_L	412	404	[mm]
A_{manto}	1,281	1,268	[m ²]
$H_{Túnel}$	3.958	4.000	[mm]
$D_{Túnel}$	989	1.000	[mm]

Dado que estas estructuras no se encuentran en el mercado, es necesario fabricarlas a medida y para esto, se redondean los valores de T y H y se recalculan los parámetros que dependen de éstos. Para el volumen se consideró un factor de seguridad del 20%.

5.7 EQUIPO DE FILTRADO (S-2)

Para el filtrado se ha determinado que un filtro rotatorio cubierto con una malla de apertura de 0,5 [mm] se adecúa a los requerimientos del proceso. En este mismo equipo se puede efectuar el lavado de las cápsulas. El diseño se ha calculado como un simple cilindro que rota mediante un motor. El volumen se ha definido de tal forma que el volumen de las cápsulas corresponda a un 40% del volumen útil del filtro, considerando además un 20% de seguridad.

Debido a que este tipo de filtros no se encuentra en el mercado, se cotizó para su fabricación a medida. La potencia requerida para este equipo fue estimada en 1,5 kW ⁷

⁷ Rodríguez H., J. (diciembre de 2014). comunicación personal. *Gerente de Ingeniería y director de Inning Group*, www.inning.cl. Viña del Mar, Chile.

Los valores obtenidos para el cálculo se muestran en la Tabla 5.17.

Tabla 5.17 Datos de diseño y características del filtro

Parámetro	valor calculado	valor seleccionado	unidades
volumen útil	40%	-	
V	315	-	[L]
L/D	2	-	-
D	586	590	[mm]
L	1.171	1200	[mm]
N	15	-	[rpm]
t	0,7	-	[h]
P ⁸	1,5	1,5	[kW]

D: diámetro L: largo

5.8 ESTANQUE DE RECEPCIÓN DE CaCl₂ (E-2)

Por su parte, el estanque de recepción CaCl₂ remanente también se utiliza para preparar y acondicionar la solución de CaCl₂ en los lotes siguientes. Tal como se muestra en la Fig. 4.10, la acumulación de NaCl y el volumen de solución aumenta con el tiempo. El volumen de solución considerado para el cálculo del volumen del estanque se calcula como el volumen alcanzado luego de 20 lotes.

Para la correcta disolución del CaCl₂ en el agua el diseño de este estanque incluye el diseño de un agitador. Para el cálculo de la potencia requerida, el número de Reynolds es fijado en 10⁵ ya que de esta forma se obtiene un régimen turbulento con fluidos de comportamiento newtoniano. Luego, se calcula la velocidad de rotación con la Ecc. 5.3 y con el número de

⁸ Rodriguez H., J. (diciembre de 2014). comunicación personal. *Gerente de Ingeniería y director de Inning Group*, www.inning.cl. Viña del Mar, Chile.

potencia, se obtiene la potencia requerida para la agitación. Se considera que utilizar un sólo impulsor de tipo hélice marina (Greaves(b), 2014), es adecuado para el caso.

Los valores de diseño obtenidos para el estanque de recepción se encuentran en la Tabla 5.18

Tabla 5.18 Datos de diseño y características del estanque de recepción y acondicionamiento de CaCl_2

símbolo	valor calculado	valor seleccionado	unidad
V_{CaCl_2}	212	300	[L]
$V_{\text{útil}}$	75%	66%	-
V_{estanque}	282	322	[L]
T	646	640	[mm]
H	861	1000	[mm]
H_L	646	640	[mm]
D	213	211	[mm]
C	213	211	[mm]
J	65	64	[mm]
W_B	43	42	[mm]
C_J	13	13	[mm]
A	1,311	1,287	[m ²]
n° paletas	2	2	-

A diferencia del anterior y al igual que el mezclador, este estanque es un recipiente común con un agitador convencional y por consiguiente es posible encontrarlo en el mercado. Las características del estanque seleccionado se muestran en la Tabla 5.18.

La potencia del agitador del estanque E-2, se calculó de la misma forma que la potencia del agitador del mezclador indicado en la sección 5.4. Los resultados del cálculo de la potencia se encuentran en la Tabla 5.19

Tabla 5.19 Resultados del cálculo de la potencia del agitador del estanque E-2

parámetro	valor	unidad
ρ	1000	[kg/m ³]

parámetro	valor	unidad
μ	0,001	[kg/m s]
Re	7,55E+04	-
N	1,66	[rps]
	100	[rpm]
N_p	0,35	-
P	0,71	[W]
n° impulsores	3	-
η	90%	-
P_T	2,35	[W]
$P_{T'}$	3,53	[W]

La potencia seleccionada es de 1,9 kW (ver Tabla. D.3 del Apéndice D).

5.9 SECADOR ROTATORIO DE CONTACTO DIRECTO (D-1)

Para el diseño de un equipo de secado, es necesario contar con una curva de secado, de tal forma de obtener la humedad crítica y humedad de equilibrio del producto. Luego, se requieren hacer pruebas piloto para verificar los tiempos de secado y las temperaturas de operación del equipo.

Ya que en este caso no se cuenta con curvas de secado de cápsulas de alginato y almidón, se ha realizado una estimación de las condiciones de operación y las dimensiones del equipo a utilizar. Como se comentó en la sección síntesis y selección de procesos, el equipo recomendado para el secado de las cápsulas es un tambor rotatorio de contacto directo, que utiliza una corriente de aire caliente para secar las cápsulas. Este equipo no ha sido encontrado en el mercado por lo que se diseña para poder fabricarlo a medida.

Las condiciones de operación sugeridas en esta sección, se adecúan para mantener la mayor viabilidad celular durante el secado. Se sabe que las cápsulas entran a 15 °C y se asume que salen a una temperatura cercana a la temperatura del aire de salida (ver secciónb)).

Los secadores de este tipo tienen una mayor eficiencia cuando el número de unidades de transferencia (Nt) se encuentra entre 1,5 y 2,5 (Mujumdar, 2006). El número de unidades de transferencia se obtiene por la ecuación Ecc. 5.14:

$$N_T = \ln \left(\frac{T_1 - T_w}{T_2 - T_w} \right)$$

Ecc. 5.14

Donde

T_1 y T_2 : temperatura del aire a la entrada y salida del secador respectivamente

T_w : temperatura de bulbo húmedo durante el proceso de secado

Tomando en cuenta este parámetro y utilizando una carta psicométrica, se determinan las siguientes características para el aire de secado:

Tabla 5.20 Características del aire de secado y condiciones de operación en el secador

	A₅	A₆	A₇
Temperatura bulbo seco (°C)	15	40	23
Temperatura bulbo húmedo(°C)	11,5	20,5	20,5
HR%	67%	15%	80%
HA [kg agua/kg aire seco]	0,007	0,007	0,014

Dado que la etapa de secado se realizará de forma discontinua, el volumen del equipo está determinado por el volumen de las cápsulas a secar (Green & Perry, 2008), las cuales representan entre un 10 y un 15% del volumen total del tambor.

Por otro lado, es necesario seleccionar el flujo de aire másico por unidad de área (G) seccional de acuerdo a las características del sólido. Valores típicos para este parámetro se encuentran entre 1 y 3 [kg/m² s] (van't Land, 1991). La relación típica entre el largo y el diámetro de estos equipos se encuentra entre las 4 y 10 unidades y se relaciona con el N_t y G seleccionados (van't Land, 1991) en el caso de secadores rotatorios continuos. Debido a que el secador diseñado se operará de forma intermitente y el tamaño del lote es relativamente pequeño, seleccionar una relación L/D de 4 a 10 lo hace muy desproporcionado. Es por esto que se ha tomado una relación L/D de 3, similar a la relación típica de un secador rotatorio a vacío (Green & Perry, 2008).

Algunos secadores rotatorios, tienen en su interior baffles que permiten una mejor distribución del material durante el secado. El número de baffles adecuado depende del diámetro del secador.

Los valores calculados para el diseño del secador se muestran en la Tabla 5.21

Tabla 5.21 Datos de diseño y características del secador rotatorio de contacto directo

parámetro	valor calculado	valor seleccionado	unidades	relaciones típicas	referencia
Volumen útil	15%	12%		10-15%	(Mujumdar, 2006)
V	701	800	[L]		(Green & Perry, 2008)
Nt	2,1			1,5 - 2,5	(Mujumdar, 2006)
L/D	3,0				(van't Land, 1991)
D	709	720	[mm]	$4 < D/L < 10$	(van't Land, 1991)
L	2.128	1.965	[mm]	$4 < D/L < 10$	(van't Land, 1991)
s	5°	5°		0° - 5°	(van't Land, 1991)
n° baffles	5	5		$5 < nf/D < 10$	(Mujumdar, 2006)
V_{aire}	3	3	[kg/m ² s]	1 - 3	(van't Land, 1991)
F_{Aire}	0,988	1,018	[m ³ /s]	-	
N	5	5	[rpm]	4 - 5	(van't Land, 1991)
t	2,5		[h]		

Dado que este equipo no se encuentran en el mercado, es necesario fabricarlo a medida y para esto, se redondean los valores de D y L y se recalculan los parámetros que dependen de éstos.

5.9.1 Intercambiador de calor de tubo y carcaza

El aire que entra al secador puede ser calentado de diferentes maneras, siendo las alternativas más comunes los gases de combustión, las resistencias eléctricas o cualquier flujo caliente que se pueda hacer pasar por un intercambiador como aceite, agua o vapor de agua. De acuerdo a esto, el tipo de intercambiador a utilizar, generalmente se selecciona de acuerdo al tipo de fluidos y al área de transferencia siendo la regla general intercambiadores de doble tubo para áreas menores a 200 pie² y de tubo y carcaza para áreas mayores a esa (Kern, 2006). Sin embargo, en el mercado existen muchos tipos de intercambiadores que abarcan un amplio rango de áreas de transferencia y para el caso de un intercambiador entre aire y vapor se considera más apropiado un intercambiador de tubo y carcaza.

Los cálculos para el diseño del calentador de aire mediante vapor se obtienen de acuerdo a los procedimientos de cálculo descritos en (Kern, 2006).

Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 5.22.

Tabla 5.22 Datos de diseño y características del intercambiador de calor

parámetro	valor	unidad
T_{vap}	121	[°C]
P_{vap}	2	bar
Q_{ext}	298.423	[kJ]
q_{ext}	33,39	[kW]
U	0,0113	[kW/m ² K]
Δ_{LMTD}	92,9	[°C]
A	31,79	[m ²]
L	6	[m]
D_i	19,05	[mm]
$sppl$	0,060	[m ² /m]
A_{tubo}	0,365	[m ² /tubo]
n° tubos	88	-
A_{max}	39,76	[m ²]
D_{carcaza}	304,8	[mm]
n° baffles	99	-

Para la impulsión del aire hacia el intercambiador, se utiliza un ventilador (V-1), el cual ha sido seleccionado acorde a los requerimientos de aire para secado (ver Tabla 5.21).

De acuerdo al flujo requerido de aire, las características del ventilador seleccionado se presenta a continuación.

Tabla 5.23 Características del ventilador

parámetro	valor	unidad
Modelo	300	-
Tamaño	420x360x430	[mm]
P_w	0,6	[kW]
N	2900	[rpm]
F_{Aire}	1	[m ³ /s]
P	500	[Pa]

Para mayor información de los equipos ver Tabla. D.3, Apéndice D.

5.10 EQUIPOS AUXILIARES

5.10.1 Calderín

Para determinar el tamaño de la caldera es necesario saber los requerimientos totales de vapor por lote de producción. A continuación se identifican todos los procesos que requieren de uso de vapor con su respectivo consumo.

Tabla 5.24 Requerimientos de vapor de caldera

Operación	Vapor [kg]	P[kW]
Esterilización R2	9	11,1
Esterilización R2'	9	11,1
Esterilización R3	91	55,4
Esterilización R3'	91	55,4
Secador	136	33,2
Total		166

El criterio de selección del equipo se hace de acuerdo al vapor necesario a generar por lote, siendo este de una capacidad de producir 200 kg de vapor por hora. La potencia para el funcionamiento es de 218 kW, por lo que se suple la necesidad requerida.

Tabla 5.25 Características calderín seleccionado

Modelo	Vapor [kg/h]	Potencia [kW]	dimensiones [mm]
Ldr0.20-0.7	200	218	700x1200x1700

5.10.2 Compresor

Para determinar el tamaño del compresor es necesario saber los requerimientos totales de aire por lote de producción. A continuación se identifican todos los procesos que requieren de uso de aire comprimido con su respectivo flujo.

Tabla 5.26 Requerimientos de aire comprimido

	Tiempo [h]	Flujo [L/min]	Volúmen [m3]
Fermentación R1	10,5	0,929	1,2
Fermentación R2	15,4	16,2	29,9
Fermentación R3	13,7	166,5	273,7
Total		184	305

Se selecciona el siguiente equipo para suministrar el aire necesario al proceso.

El criterio de selección del equipo se hace de acuerdo al aire necesario a generar por lote, siendo este de un flujo de 184 L/h. A continuación se presenta una tabla descriptiva del equipo seleccionado.

Tabla 5.27 Características compresor seleccionado

Modelo	Flujo salida [L/min]	Presión de trabajo [bar]	Potencia [kW]	dimensiones [mm]
4418000012	250	8	2,2	115x45x85

5.10.3 Bombas

Las bombas requeridas se ilustran en el diagrama de flujo del proceso, y de acuerdo a cada fluido a transportar se selecciona la bomba.

Tabla 5.28 Características de las bombas seleccionadas

Bomba	Tipo	Flujo [L/h]	Potencia [kW]
B-1	peristáltica de tubo	500	0,25
B-2	peristáltica de tubo	200	0,25
B-3	peristáltica de tubo	500	0,25
B-4	peristáltica de manguera	168	0,30
B-5	centrífuga	50	0,37
B-6	centrífuga	500	0,37
B-X ₁	peristáltica de tubo	500	0,25
B-X ₄	peristáltica de manguera	168	0,30
B-X ₅	centrífuga	500	0,37

CAPÍTULO 6

ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA: DISTRIBUCION DE EQUIPOS Y PROGRAMACIÓN DE OPERACIONES Y PROCESOS

La producción de biomasa estimada en 235 kg al año 2024, como se indica en la sección 2.6, será capaz de cubrir el 20% de las hectáreas cultivables. De esta manera se diseñó la planta con una producción inicial del 70% de la capacidad de la planta, de aumentando gradualmente hasta su máximo hasta el año 2024 como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 6.1 Estimación de la producción de biomasa a partir de la demanda proyectada

Año	Producción [kg]	Producción capsulas [kg]	Capacidad Utilizada [%]
0	-		
1	165	3.755	70%
2	165	3.755	70%
3	165	3.755	70%
4	188	4.291	80%
5	188	4.291	80%
6	188	4.291	80%
7	212	4.827	90%
8	212	4.827	90%
9	212	4.827	90%
10	235	5.364	100%

Se decide operar en paralelo de manera de tener una producción anual total de 174 lotes (87 por cada línea) para el 2024. Se considera un total de 330 días trabajados al año, donde se descontaron los 5 feriados legales, 20 días para mantención y/o revisiones técnicas y 5 días de imprevistos, por lo que se dispondrá de un tiempo de 91 días por lote.

La producción de un lote contempla 3 grandes etapa: propagación, producción y formulación. La etapa de propagación consta de la propagación del inóculo necesario para alimentar a los reactores principales, la que consta de una serie de fermentaciones en serie, tomando un tiempo de 2 días, incluyendo también el tiempo de carga y descarga de los equipos. La

fermentación principal considera un tiempo de 15 h, mientras que la etapa de formulación solo consta de 11 h.

6.1.1 Planificación y organización de las etapas de producción

Para un mejor control del correcto funcionamiento de la planta, es que se propone la organización de las distintas tareas de las etapas de producción en un diagrama de Gantt. Este diagrama permite ver de manera fácil y dinámica las distintas actividades que deben realizarse por hora y hora. En este caso se considera como base un lote de producción, desde comienzos de la etapa de propagación hasta el término de la formulación.

Considerando que para el 2024 la producción anual debe ser de 235 kg de biomasa, se harán 87 lotes por línea de producción, de manera que la producción será de 2 lotes por cada línea de producción en total por semana. La distribución de los tiempos de cada tarea se puede apreciar en la Fig. 6.1 y en detalle en los planos anexados al final de este informe. Cabe destacar que si en algún momento alguna línea de producción sufre un desperfecto o se atrasa, no generaría inconvenientes, ya que se consideró dejar el día viernes prácticamente libre, de manera de poder flexibilizar un poco los tiempos descritos en la carta Gantt.

Se debe considerar que todas las tareas son operaciones por lote, por lo que se requiere el término de la tarea anterior para seguir con la siguiente. Tanto el proceso de propagación como de producción llevan un control de calidad, donde se toman muestras durante y al término de la fermentación para asegurar la calidad y esterilidad del cultivo. En caso de existir algún problema de contaminación o esterilidad, el lote se debe detener, y luego de las especificaciones pertinentes del jefe de turno se procede a realizarlo de nuevo.

Los insumos como el alginato, almidón y medio de cultivo serán suministrados por proveedores hasta la planta; no se considera un tratamiento extra de las aguas residuales, ni convenio complementario con alguna sanitaria, ya que la descarga al servicio de alcantarillado cumple con el D.S. 609.

6.2 ORGANIZACIÓN ADMINISTRATIVA

La evaluación de este proyecto busca comprobar la factibilidad tanto técnica como económica de instalar una planta productora de microorganismos benéficos para su uso en agricultura en Chile, por lo que se propone es una empresa pequeña, nueva en el mercado, que fabrique un producto que luego será entregado a distribuidores, los que se harán cargo de la comercialización de él. La empresa tendrá una organización funcional, de manera de tener especialistas en todos los niveles, así una mejor supervisión técnica como, ya que cada cargo responde ante expertos en su campo de especialización. La organización se divide en 4 áreas como muestra la Fig. 6.2: investigación y desarrollo, producción, ventas y finanzas.



Fig. 6.2 Organización administrativa de la empresa

El departamento de producción se hará cargo de todas las tareas de las etapas de producción, desde la recepción de los insumos hasta la formulación del producto. Dentro de las principales tareas se encuentran la realización y supervisión del proceso productivo, la mantención de equipos, puesta en marcha de cada lote, etc., ya que los integrantes de este departamento serán los encargados de la planta piloto. El departamento de gerencia general está encargado del área de adquisición y ventas estará enfocado a dos áreas, la primera a la relación con los proveedores y órdenes de compra de materias primas y la segunda a la venta del producto y relaciona con los distintos distribuidores y clientes. El departamento de administración y finanzas estará encargado de la contabilidad de la empresa, de los recursos humanos, entre otros.

6.2.1 Cargos necesarios por departamento

De acuerdo a las distintas tareas mencionadas en la sección 6.1.1 y departamentos en la sección 6.2 se detalla la cantidad de personal requerido en la empresa. La cantidad fue estimada de acuerdo a la complejidad de la tarea a realizar, contemplando si el cargo se ejecuta en forma de turno u horario de oficina.

Tabla 6.2 Cargos por departamento

Departamento	Cargo	Perfil	Cantidad
Gerencia	Gerente	Ingeniero Agrónomo/Bioquímico con Doctorado	1
	Secretaria	Secretariado Ejecutivo	1
Producción	Jefe de planta	Ingeniero de Ejecución en Bioprocesos	1
	Operarios	Técnico operador de plantas industriales	9*
Administración y Finanzas	Encargado de contabilidad	Contador Auditor	1
Adicional	Personal aseo	Personal de Aseo	1
	Seguridad	Portero Seguridad	1

La operación con modalidad de turnos se distribuirá de la siguiente manera:

- Cada día habrá 3 turnos, cada uno de 8 horas.
- Para los días lunes, martes, jueves y viernes se cuenta con 3 operadores por turno.
- Para el día miércoles se contará con 6 operadores por cada turno, debido a la alta demanda de tareas (ver Fig. 6.1).

Se considera que la planta operará de lunes a viernes, ya que se hace innecesario operar los fines de semana para esta tasa de producción.

6.3 DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA PLANTA

Para determinar la superficie total de la planta, es necesario considerar el área ocupada por la planta principal y los distintos departamentos de la empresa. Se debe tener en cuenta que el área ocupada por los equipos de la planta representa alrededor del 20% de la superficie de la planta piloto. De acuerdo a las dimensiones de la Tabla 6.3, se estima que la planta piloto será de alrededor de 30 m².

Tabla 6.3 Dimensión de equipos en planta piloto

Nomenclatura	Equipos	Área basal m²
A-1	Autoclave	1,00
E-1	Estanque recepción y acondicionamiento	1,00
E-2	Estanque gelificación	0,42
IC-1	Intercambiador de calor secador	0,95
M-1	Mezclador 1	0,49
M-2	Mezclador 2	0,21
S-1	Centrífuga 1	0,24
S-2	Filtro	1,00
D-1	Secador	1,90
R-1	Fermentador 1	0,02
R-1'	Fermentador 1'	0,02
R-2	Fermentador 2	0,10
R-2'	Fermentador 2'	0,10
R-3	Fermentador 3	0,49
R-3'	Fermentador 3'	0,49
Total Equipos		8,42

Tabla 6.4 Dimensión de las instalaciones de la planta

	Área/unidad m²	nº	Total m²
Oficinas	9	4	36
Planta piloto	30	2	60
Bodega	10	1	10
Baños	5	3	14
Camarines	5	1	5
Comedor	9	1	9
Cocina	11	1	11
Laboratorio	10	1	10

	Área/unidad m²	n°	Total m²
Recepción	6	1	6
Sala de reuniones	12	1	12
Estacionamiento	15	8	120
Subterráneo	9	1	9
Total			302

Se estima que la superficie de terreno total a utilizar por la planta productora de microorganismos, será de aproximadamente 3 veces la superficie construida. De esta manera se requiere de un terreno de 1000m².

CAPÍTULO 7

EVALUACIÓN ECONÓMICA

Para llevar a cabo la evaluación económica del proyecto, se debe realizar un análisis de flujo de caja incluyendo la inversión, los costos de producción y las ganancias. Este análisis permite estudiar varios escenarios, y con ello determinar las condiciones que influyen en la rentabilidad o no rentabilidad del proyecto.

La unidad monetaria utilizada en este capítulo corresponde a la unidad de fomento (UF) para lo cual se han utilizado los indicadores económicos del día 2 de Diciembre de 2014 presentados en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1 Indicadores económicos

Fecha: 2 de Diciembre de 2014	
Indicador Económico	Valor [CLP]
Unidad de Fomento (UF)	24.578,14
Dólar Estadounidense [USD]	614,77
Euro (EUR)	761,99

7.1 COSTO TOTAL DE INVERSIÓN

El costo total de inversión o costo de capital (CTI) se obtiene a partir del costo fijo de inversión (CF) y el costo de capital de trabajo (CW) (Peters, Timmerhaus, & West, 2003). En la Tabla. D.2 del Apéndice D, se describen resumidamente los componentes de cada costo.

7.1.1 Costo fijo de inversión (CF)

De los costos fijos de inversión, el terreno y los equipos son costos directos que se pueden definir de acuerdo a la ubicación de la planta y a la evaluación técnica realizada. Los costos

adicionales directos, se pueden estimar a partir de los anteriores. Los costos fijos indirectos se pueden obtener a partir de los costos fijos directos totales (CF).

a) Costo de los equipos

Para estimar el costo invertido de los equipos, se han realizado cotizaciones en distintas empresas para aquellos equipos disponibles en el mercado. Algunos costos fueron calculados como el promedio de dos cotizaciones cuando se consideró pertinente. Para equipos específicos como el secador (D-1) y el estanque de gelificación (E-1), los costos se han estimado para su fabricación.

Es necesario destacar que el costo de un equipo cotizado en el extranjero, generalmente es de tipo F.O.B o *free on board*, el cual no considera los costos asociados al transporte y seguro de embarque. El costo CIF, que incluye el costo de la mercancía, la prima del seguro y el valor de flete de traslado, generalmente se considera un 10% mayor al costo F.O.B. (Peters, Timmerhaus, & West, 2003; Servicio Nacional de Aduanas de Chile). Además del costo de transporte y el seguro de embarque, las importaciones están afectas al pago del derecho ad valorem (6%) sobre su valor CIF y pago del IVA (19%) sobre su valor CIF más el derecho ad valorem. Este último costo no será considerado debido a que se asumirá descuento del IVA por ser una empresa.

Por último, el costo de instalación de los equipos también debe ser considerado. Este costo se puede estimar a partir de un porcentaje del costo efectivo del equipo, dependiendo de las características y la dificultad de instalación. En la literatura existen valores típicos para estos costos de acuerdo al tipo de equipo (Peters, Timmerhaus, & West, 2003). Sin embargo, luego de consultar en una empresa de ingeniería⁹ se decidió estimar los costos de instalación como

⁹ Rodríguez H., J. (diciembre de 2014). comunicación personal. *Gerente de Ingeniería y director de Inning Group*, www.inning.cl. Viña del Mar, Chile.

\$ 1.000 USD por equipo (sin considerar bombas) y \$ 2.000 USD para el estanque de gelificación y el túnel de pre-gelificación.

En Tabla 7.3, se indican los costos de los equipos en cada una de las etapas hasta la instalación. Para mayor información acerca de las cotizaciones ver Tabla. D.3 del Apéndice D.

b) Costo del Terreno

El terreno total requerido corresponde al costo total construido y al terreno disponible para tránsito, estacionamientos, áreas verdes y futuras expansiones de la planta. De acuerdo a lo señalado en la sección 6.3, el terreno cotizado es de 500 m² ubicado en la región del Bío Bío como se señala en la sección 2.7.

El terreno cotizado corresponde a un sector industrial en la ciudad de Los Ángeles, el cual se tomará como referencia para estimar el costo del terreno. El valor de la UF/m² es de 1.5, por lo que el terreno de 500 m² tendría un valor de 750 UF.

De acuerdo a los mejoramientos y la habilitación del terreno, se estimó un valor de 81 UF¹⁰.

c) Costos adicionales directos (CFD)

Estos costos pueden ser considerados como un porcentaje asociado al costo de los equipos entregados (valor antes de la instalación) (Peters, Timmerhaus, & West, 2003). En la Tabla 7.2, se muestran los valores de porcentajes típicos en plantas de proceso.

Tabla 7.2 Porcentaje típico para el cálculo del costo adicional directo

Componente del costo	Porcentaje del costo del equipo
Aislación	8-9%

¹⁰ Rodríguez H., J. (diciembre de 2014). comunicación personal. *Gerente de Ingeniería y director de Inning Group*, www.inning.cl. Viña del Mar, Chile.

Componente del costo	Porcentaje del costo del equipo
Instrumentación y control	8-50%
Cañerías	16-80%
Sistemas eléctricos	10-40%
Servicios de construcción y edificios	45-68%
Instalaciones de servicio	30-80%

Tabla 7.3 Costo de los equipos

Etapa	Equipo	Costo F.O.B. 2014 [USD]	Costo F.O.B. [UF]	Costo CIF [UF]	Costo [UF]	Costo Instalado [UF]	Cantidad
Fermentación							
	M-1	5.000	125	138	146	171	2
	A-1	2.000	50	55	58	83	1
	R-1	15.000	375	413	437	462	2
	R-2	20.000	500	550	583	608	2
	R-3	30.000	750	825	875	900	2
	C-1	8.000	200	220	233	258	1
	C-2	1.000	25	28	29	54	1
	B-1	1.200	30	33	35	35	2
	B-2	1.200	30	33	35	35	2
	B-X ₁	1.200	30	33	35	35	1
Sub-total		157.000	3.927	4.320	4.579	4.854	16
Formulación							
	S-1	27.071	677	745	790	815	1
	M-2	3.500	88	96	102	127	1
	J-1	37.184	930	1.023	1.084	1.109	1
	E-1	15.000	375	413	437	488	1
	S-2	2.500	63	69	73	98	1
	E-2	5.000	125	138	146	171	1
	D-1	18.000	450	495	525	550	1
	IC-1	1.500	38	41	44	69	1
	V-1	3.253	81	90	95	120	1
	B-3	1.200	30	33	35	35	2

Etapas	Equipo	Costo F.O.B. 2014 [USD]	Costo F.O.B. [UF]	Costo CIF [UF]	Costo [UF]	Costo Instalado [UF]	Cantidad
	B-4	2.000	50	55	58	58	1
	B-5	500	13	14	15	15	1
	B-6	500	13	14	15	15	1
	B-X ₄	2.000	50	55	58	58	1
	B-X ₅	500	13	14	15	15	1
Sub-total		120.908	3.024	3.327	3.526	3.776	16
Otros							
	equipo a vacío para empaque	600	15	17	17	17	-
	balanzas	367	9	10	11	11	-
	agitadores de laboratorio	800	20	22	23	23	-
	refrigerador	1.300	33	36	38	38	-
	horno de laboratorio	600	15	17	17	17	-
	instrumentación de laboratorio	100	3	3	3	3	-
	empaques	360	9	10	10	10	-
	otros	825,4	21	23	24	24	-
Sub-total		4.952	124	136	144	144	
Total		282.861	7.075	7.783	8.250	8.775	32

*Los precios indicados para cada equipo son unitarios. En los costos sub-totales y totales se considera la cantidad de equipos a comprar.

El costo de aislación fue omitido ya que esta empresa no opera con temperaturas extremas (Peters, Timmerhaus, & West, 2003). El costo de los sistemas eléctricos, se estimó en \$ 750 USD por motor instalado¹¹, con un total de 28 motores considerando las bombas, y por último el costo de edificación fue estimado de acuerdo al área construida y los requerimientos de cada espacio (verTabla 6.4).

Los costos adicionales considerados directos y sus respectivos porcentajes respecto del costo de los equipos entregados se muestran en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4 Costos fijos directos adicionales

Componente del costo	% costo total de equipos	UF
Instrumentación y control	15%	1.237
Cañerías	30%	2.475
Sistemas eléctricos	-	525
Servicios de construcción y edificios	-	4.027
Instalaciones de servicio	20%	1.650
Total		9.996

d) Costos fijos indirectos (CI)

Los costos fijos indirectos se calculan a partir de los costos fijos directos totales (CFD) mencionados anteriormente.

En la Tabla 7.5 se muestran los valores típicos, el porcentaje seleccionado y el valor correspondiente en UF.

Tabla 7.5 Costos fijos indirectos

Componente del costo	Valores típicos	% del costo directo total (CFD)	UF
Ingeniería y supervisión	8%	8%	1.562
Servicios de construcción	8-10%	0%	0
Costos legales	1-3%	3%	586
Empresa constructora	1,5-6%	0%	0
Total			2.147

¹¹ Rodríguez H., J. (diciembre de 2014). comunicación personal. *Gerente de Ingeniería y director de Inning Group*, www.inning.cl. Viña del Mar, Chile.

Para el caso de los servicios de construcción y la empresa constructora, éste costo estaría incluido en el costo de servicios de construcción y edificios¹².

e) Contingencias

Otro costo indirecto que suele ser considerado corresponde a los gastos por contingencia. Este costo suele estimarse en un 10% del costo fijo total (CF) (Peters, Timmerhaus, & West, 2003), lo que corresponde a 2.408 [UF].

f) Resumen costo fijo de inversión

En la Tabla 7.6 se muestra un resumen de todos los costos asociados al costo fijo total de inversión (CF).

Tabla 7.6 Resumen costo total fijo

Costo fijo (CF)	UF
Costo fijo directo (CFD)	19.521
Costo fijo indirecto (CFI)	2.147
Contingencias	2.408
Total	24.076

7.1.2 Costo de capital de trabajo (CW)

El costo de capital de trabajo se relaciona con los costos asociados a la puesta en marcha de la planta y al abastecimiento de materias primas y otros insumos para el primer mes de trabajo. Generalmente se considera un 10% del costo total de inversión (Peters, Timmerhaus, & West, 2003), lo que corresponde a 4.249 UF.

¹² Rodríguez H., J. (diciembre de 2014). comunicación personal. *Gerente de Ingeniería y director de Inning Group*, www.inning.cl. Viña del Mar, Chile.

7.1.3 Resumen costo total de inversión

Luego el costo total de inversión queda determinado por el costo total fijo y el costo de capital de trabajo. En la Tabla 7.7 se resumen los costos asociados al costo total de inversión.

Tabla 7.7 Resumen costo total de inversión

Costo total de inversión (CTI)	UF
Costo fijo (CF)	24.076
Costo de capital de trabajo (CW)	4.249
Total	28.324

7.2 COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN (CTP)

El costo total de producción contempla los costos de manufactura (CM) y los costos generales de producción (CGP). Si bien en bibliografía los costos de mano de obra, mantenimiento y reparaciones, suministros de operación y costos de laboratorio son definidos como costos variables de manufactura (Peters, Timmerhaus, & West, 2003), para este caso se dejan como fijos, ya que se considera que no dependen de la cantidad de producto a elaborar. Así por ejemplo, la mano de obra se considera la misma requerida para hacer funcionar la planta a un 70 y a un 100% de su capacidad.

Por lo tanto, el costo de producción total se divide en materias primas y suministros básicos considerados como costos variables que dependen directamente de la cantidad a producir, y los costos asociados a mano de obra, mantención, reparaciones y suministros de operación, etc. son considerados costos fijos independientes de la producción.

7.2.1 Costos de manufactura (CM)

a) Materia prima

La cantidad de materia prima requerida, se calcula para la producción establecida al año 2024, y sus costos asociados se muestran en la Tabla 7.8.

Tabla 7.8 Costo de materias primas

Materias primas	Kg/año	\$ USD/kg	UF/año
CaCl₂	549	3,5	48,04
Alginato	447	15,5	173,45
Almidón	4.474	0,5	55,95
Sacarosa	746	0,5	8,95
Extracto de levadura	112	8,8	24,64
K₂HPO₄	49	4,0	4,93
KH₂PO₄	12	4,8	1,44
CaSO₄	2	0,5	0,03
NaCl	8	0,3	0,06
MgSO₄ *7H₂O	8	0,2	0,04
NaMoO₄ *2H₂O	0	64	0,32
FeSO₄ *7H₂O	1	4,5	0,12
Total	6.407	107	318

(Servicio Nacional de Aduanas de Chile, 2014)

Todos los costos fueron obtenidos de las partidas arancelarias del Servicio Nacional de Aduanas de Chile, utilizando el valor de CIF unitario como precio de referencia. En algunos casos se obtuvo un promedio de los datos encontrados, ya que el CIF unitario depende de la cantidad importada y de los costos asociados a la embarcación y seguro. En aquellos casos donde existe una gran diferencia de precios, se seleccionaron los menores o aquellos que indicasen en su descripción, de uso industrial. En la sección 7.4.2, se puede observar la dependencia del precio de las materias primas con la rentabilidad del proyecto.

b) Suministros básicos

Los suministros básicos utilizados en este proceso son primordialmente electricidad y agua.

En la Tabla 7.9 se resumen los costos asociados al consumo de agua [m³/año] y energía [kW-h/año] en el año 2024. El consumo de agua también considera el lavado de los equipos, el cual se estima en un 10% del volumen de éstos. Para el caso de la centrífuga de discos y el equipo Jetcutter, el agua de lavado se estima como un caudal de lavado por 10 minutos. Para mayor información revisar las tablas Tabla 5.11, Tabla 5.15 y Tabla. D.7 del Apéndice D.

Tabla 7.9 Costo de suministros básicos

Tipo de suministro	Consumo anual	Valor por unidad de consumo [CLP]	Costo [UF/año 2024]
Agua [m³]	610	1.241*	31
Electricidad [kWh]	73.963	65*	196
Total			227

Las tarifas de luz y electricidad se obtuvieron de la Comisión Nacional de Energía y de la Superintendencia de Servicios Sanitarios, respectivamente. Es importante destacar que la tarifa del agua incluye los costos de servicio de alcantarillado. Esta planta, al ser una planta pequeña y no tener grandes cantidades de desechos, puede utilizar los servicios de la empresa sanitaria para tratar sus residuos.

c) Resumen costos de manufactura (CM)

Como se mencionó anteriormente, los costos variables se han calculado para el año 2024, lo que corresponde a la máxima capacidad de la planta. Para desarrollar el flujo de caja, es necesario recalcular los costos de producción año a año, ya que dependen directamente de la producción. Para esto se calcula el costo por kg de producto en el año 2024, y se utiliza este factor para obtener los costos de los años anteriores.

Considerando una producción máxima de 235 kg de biomasa lo que equivale a 5.364 kg de producto al año 2024, y un costo total de 544 UF (ver Tabla 7.15) se obtiene un factor de 0,1 [UF/kg de producto]. En la Tabla 7.10 se muestran los costos variables en los 10 años de proyección, comenzando con un 70% de la capacidad de la planta el año 2015.

Tabla 7.10 Costo de manufactura anual

Año	Producción [kg producto/año]	CM [UF/año]
2014	-	-
2015	3.755	381
2016	3.755	381
2017	3.755	381
2018	4.291	435
2019	4.291	435
2020	4.291	435
2021	4.827	490
2022	4.827	490
2023	4.827	490
2024	5.364	544

7.2.2 Costos fijos de producción (CFP)

a) Mano de obra

El costo de mano de obra depende de la cantidad de operarios y personal que se requiere para el funcionamiento de la planta, los que se detallan en la Tabla 7.11, el número de operarios requeridos se basa en lo determinado en la sección 6.2.1. Los meses pagados en el año son considerados como 12.

Para la determinación de los sueldos se obtuvo un valor estimado de sueldo bruto para cada cargo, obtenidos de la base de datos pública del Ministerio de Educación del gobierno de Chile.

Tabla 7.11 Costo anual de mano de obra

Cargo	\$ CLP líquido/mensual	\$ CLP bruto/mensual	\$ CLP total/mensual	UF/año
Gerente	2.000.000	2.500.000	2.500.000	1.220
Secretaria	400.000	500.000	500.000	244
Jefe de planta	720.000	900.000	900.000	439
Operarios	520.000	650.000	3.900.000	2.380
Subgerente	1.200.000	1.500.000	1.500.000	732

Cargo	\$ CLP líquido/mensual	\$ CLP bruto/mensual	\$ CLP total/mensual	UF/año
Encargado de contabilidad	720.000	900.000	900.000	439
Personal aseo	200.000	250.000	250.000	122
Seguridad	200.000	250.000	250.000	122
Total				5.698

b) Costos fijos adicionales de producción

Los costos fijos de producción mencionados anteriormente, son calculados como un porcentaje de algún costo previamente estimado o calculado como se indica en la Tabla 7.12.

Tabla 7.12 Costos fijos adicionales de producción

Componente del costo	Valores típicos	%	[UF/año]
Mantenimiento y reparaciones	2-10% (CF)	7%	1.685
Suministros de operación	15% ($C_{\text{mantención}}$)	15%	253
Costo de laboratorio	10-20% ($C_{\text{m.o. producción}}$)	10%	171
Seguros	1% (CF)	1%	241
Costos generales de la planta	50-70% ($C_{\text{m.o. producción}}$)	50%	854
Total			3.204

(Peters, Timmerhaus, & West, 2003)

Los valores típicos seleccionados fueron estimados considerando que la planta es una planta pequeña y que opera con flujos tanto líquidos como sólidos.

c) Resumen costos fijos de producción

En la Tabla 7.13 se resumen los costos fijos de producción

Tabla 7.13 Costos fijos de producción

Costo fijo de producción (CFP)	[UF/año]
Costo de mano de obra	5.698
Costos fijos adicionales de producción	3.204
Total	8.902

7.2.3 Costos generales de producción (CGP)

Estos costos generales están asociados a costos administrativos, de distribución, marketing, investigación y desarrollo, los cuales también corresponden a un porcentaje de otros costos previamente calculados. Estos costos también se consideran como parte de los costos fijos, siendo independientes de la producción. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 7.14.

Tabla 7.14 Costos generales de producción

Componente del costo	Valores típicos	%	[UF/año]
Costos administrativos	15-25% (C _{m.o.} producción)	10%	171
Distribución y marketing	2-20% (CTP)	2%	207
Investigación y desarrollo	2-5% (CTP)	5%	517
Total			895

7.2.4 Resumen costo total de producción

En la Tabla 7.15 se resumen los costos totales de producción

Tabla 7.15 Costo total de producción

Costos de producción (CTP)	[UF/año]
Costo variable de producción (CVP)	544*
Total costos variables	544*
Costo fijo de producción (CFP)	8.902
Costo general de producción (CGP)	895
Total costos fijos	9.797

*año 2024

7.3 INGRESOS

Para determinar los ingresos, es necesario definir un precio de venta, el cual se obtiene acorde al análisis de sensibilidad en la sección 7.4.1. El precio de venta seleccionado es de 15 [USD/ha], lo que corresponde a un 35% del precio de venta del producto TwinN¹³ y de otros productos relacionados como Bacthon distribuido por la empresa Sanagro.

Considerando una aplicación de 10^{11} [UFC/ha] como se indica en la sección 2.6 y que el producto tiene una concentración de células viables de $8,8 \cdot 10^9$ [UFC/g de producto], se requieren 11,4 gramos de producto para inocular una hectárea. Si el producto se vende a 15 [USD/ha] el valor de venta por kg es de USD 1.318. Luego, se obtienen los ingresos por año en UF de acuerdo a la producción, multiplicando el precio de venta por la cantidad de producto elaborado en el año. Los ingresos anuales se muestran en la Tabla 7.16.

Tabla 7.16 Ingresos por venta

Año	Producción [kg/año]	Ingresos por venta [USD/año]	Ingresos por venta [UF/año]
2014	-		-
2015	3.755	USD 4.949.064	123.790
2016	3.755	USD 4.949.064	123.790
2017	3.755	USD 4.949.064	123.790
2018	4.291	USD 5.656.073	141.475
2019	4.291	USD 5.656.073	141.475
2020	4.291	USD 5.656.073	141.475
2021	4.827	USD 6.363.082	159.159
2022	4.827	USD 6.363.082	159.159
2023	4.827	USD 6.363.082	159.159
2024	5.364	USD 7.070.091	176.843

¹³ Charaff S., Y. (mayo de 2014). comunicación personal vía e-mail. *Ingeniero Agrónomo, AmEcological S.A., <http://www.amecological.com>*

7.4 FLUJO DE CAJA Y ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

En el flujo de caja se ha decidido incorporar los efectos tributarios de la depreciación y del cobro de impuestos a las utilidades, ya que al considerar los efectos tributarios sobre el proyecto, éste se evalúa un escenario menos favorable.

Con respecto al impuesto a la renta, éste se considera de un 25% (Gobierno de Chile, 2014). Desde el punto de vista del inversionista, se considera una TRMA del 25% por ser un proyecto con nuevas instalaciones para un nuevo producto, lo cual es bastante exigente, sin embargo para el caso se considera apropiado. La evaluación se realiza en un plazo a 10 años, considerando el valor libro de los equipos y otros elementos depreciables igual a cero, es decir que éstos se deprecian totalmente.

Para el caso de los inmuebles la depreciación se realiza en 3 años y para el caso de los equipos ésta se realiza en 5 años (SII, 2003), ambas de forma acelerada.

La depreciación se calcula de acuerdo a la Ecc. 7.1

$$d = \frac{C_i - V_L}{n}$$

Ecc. 7.1

Donde:

d: depreciación [UF]

Ci: Costo inicial del bien [UF]

VL: Costo final o valor libro [UF]

n: años en que se deprecia el bien

El flujo de caja del proyecto para un valor de venta de USD 15 por hectárea, se observa en la Tabla 7.17 y en la Fig. 7.1

Tabla 7.17 Flujo de caja del proyecto

n	Ingresos [UF]	Inversión [UF]	Costos [UF]		FAI [UF]	D [UF]	FSI [UF]	Impuestos [UF]	FDI [UF]	VAN	TIR
			Fijos	Variables							
0		-28.324			-28.324	0	0	0	-28.324		
1	123.790		-9.797	-381	113.613	5.060	108.553	27.138	86.474	40.855	205%
2	123.790		-9.797	-381	113.613	5.060	108.553	27.138	86.474	96.199	285%
3	123.790		-9.797	-381	113.613	5.060	108.553	27.138	86.474	140.474	301%
4	141.475		-9.797	-435	131.243	1.755	129.488	32.372	98.871	180.971	305%
5	141.475		-9.797	-435	131.243	1.755	129.488	32.372	98.871	213.369	306%
6	141.475		-9.797	-435	131.243	0	131.243	32.811	98.432	239.172	306%
7	159.159		-9.797	-490	148.872	0	148.872	37.218	111.654	262.588	306%
8	159.159		-9.797	-490	148.872	0	148.872	37.218	111.654	281.320	306%
9	159.159		-9.797	-490	148.872	0	148.872	37.218	111.654	296.306	306%
10	176.843		-9.797	-544	166.502	0	166.502	41.626	125.627	309.796	306%
10					750						

FAI: Flujo antes de impuestos D: Depreciación FSI: Flujo sujeto a impuestos FDI: Flujo después de impuestos

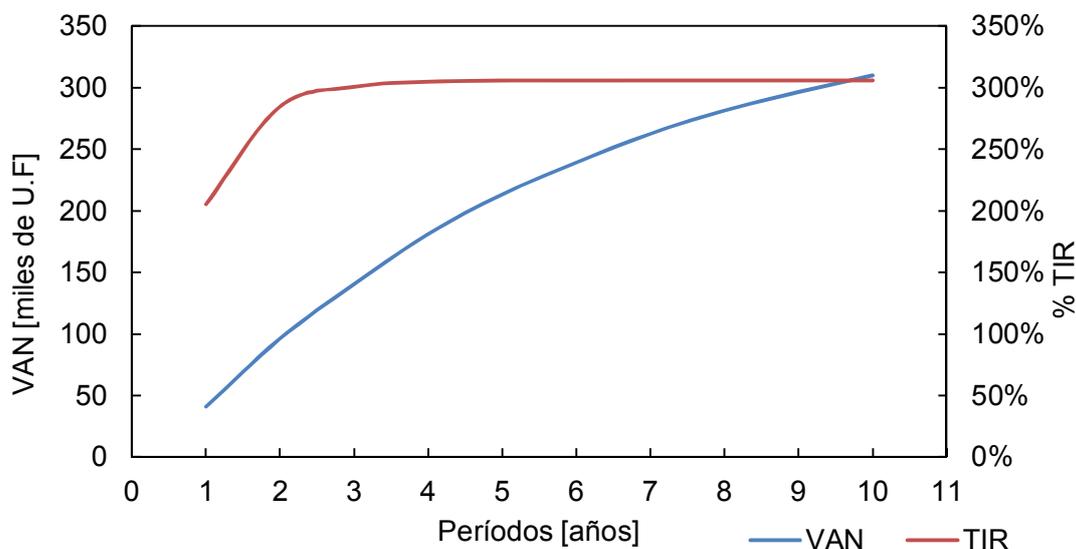


Fig. 7.1 Flujo de caja del proyecto

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede decir que los valores son bastante irreales tanto para el VAN con un TRMA del 25% como para el TIR. Se cree que la causa principal de esta extremada rentabilidad es debido a los ingresos y no a la estimación de los costos, ya que tanto los costos como la inversión fueron consultados con un experto y no debiesen estar tan alejados de la realidad. De acuerdo a los ingresos, el precio de venta no se considera alto en comparación con el mercado, por lo que se prevé que existe un error en la estimación de la demanda y con ello la capacidad de la planta. Es posible que cubrir un 20% del mercado, es decir un 20% de las hectáreas cultivables en Chile, sea una aspiración muy alta y poco realista.

7.4.1 Modificaciones en el precio de venta del producto

Para estimar el precio de venta mínimo del producto en el mercado, se buscó mediante iteración simple el precio al cual el VAN dio un valor de cero al año 10. Se obtiene un precio de USD 2,2 por hectárea, lo que quiere decir que si el producto se vende a este precio, el capital se recupera recién a los 10 años de funcionamiento del proyecto. De acuerdo a esto se consideraron 4 escenarios más (2,5; 5; 15; 42,5 [USD/ha]), considerando el precio de venta del producto TwinN como el precio tope.

El escenario se presenta en la Fig. 7.2.

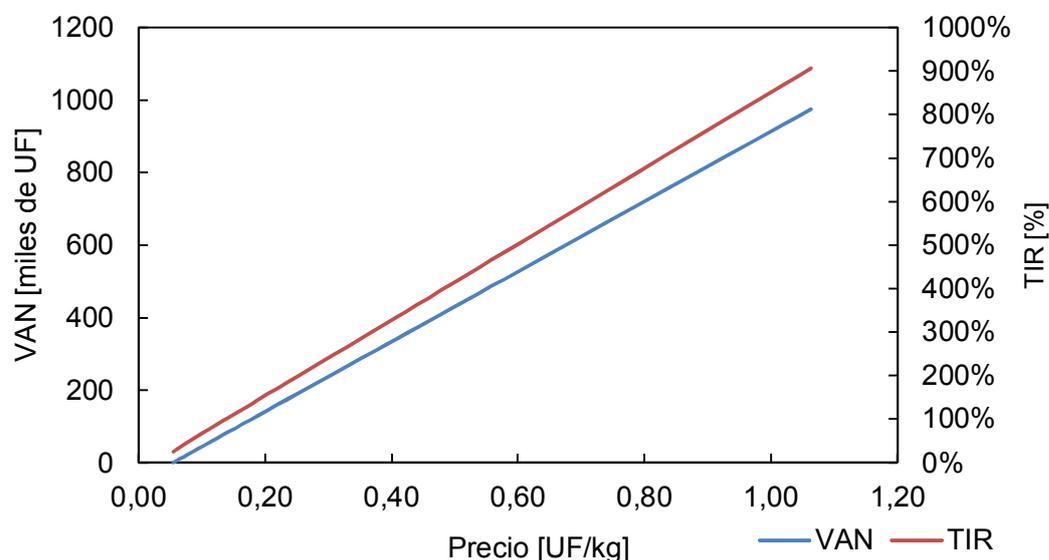


Fig. 7.2 Efecto del precio de venta del producto

El precio de venta seleccionado es de USD 15 por hectárea, ya que este proyecto considera sólo producción y distribución pero no necesariamente venta directa. Esto quiere decir que el vendedor final puede generar utilidades si lo vende a un precio como el del producto TwinN. Además es importante destacar que el producto tiene un valor agregado al ser un producto innovador en cuanto a su formulación.

7.4.2 Modificaciones en el precio de la materia prima

De acuerdo al análisis de sensibilidad realizado, el precio de la materia prima no afecta a la rentabilidad del proyecto (ver Fig. 7.3). Los precios correspondientes al alginato (producto más caro), se varían desde cero hasta el precio más caro encontrado en el mercado que corresponde a la marca Sigma Aldrich de uso analítico (Servicio Nacional de Aduanas de Chile), el cual tiene un valor de USD 396,9.

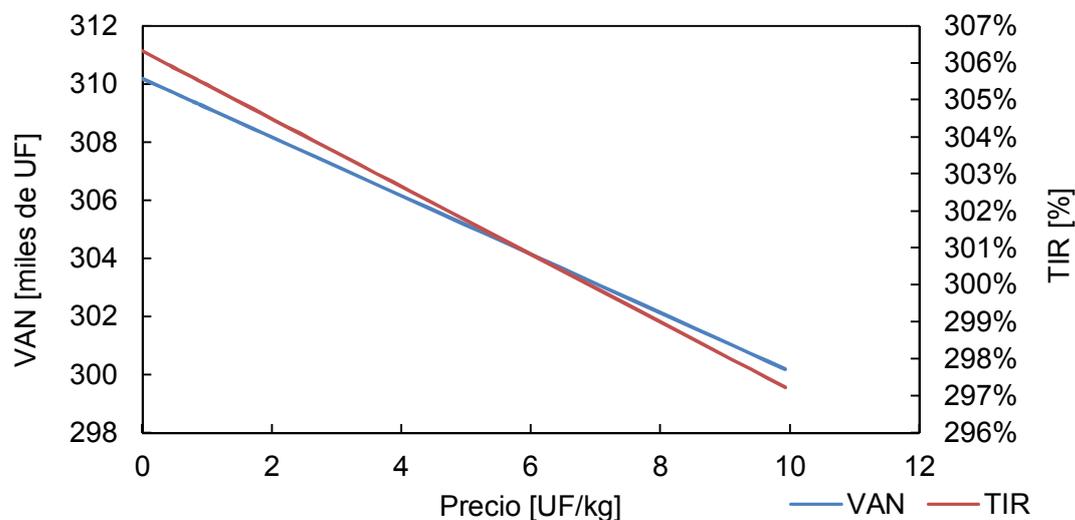


Fig. 7.3 Efecto de la variación del costo de alginato

7.4.3 Modificaciones en el rendimiento de viabilidad celular

Se estudió el comportamiento del rendimiento de viabilidad celular con respecto al rendimiento del proyecto. De acuerdo a esto, se obtuvo que el mínimo rendimiento de viabilidad celular en el secador (punto crítico) para que el proyecto se haga rentable, es de un 5,8%, siendo el período de recuperación de capital de 10 años. Sin embargo, cuando el rendimiento aumenta a un 10%, el proyecto se hace rentable con un TIR del 63% el último año y un período de recuperación de 3 años para una TRMA del 25%. Este cambio es muy sensible y se puede apreciar, ya que a un leve aumento en el rendimiento de viabilidad, el proyecto aumenta o disminuye su rentabilidad de forma pronunciada.

En la Fig. 7.4 se muestra el efecto de la viabilidad en la rentabilidad del proyecto.

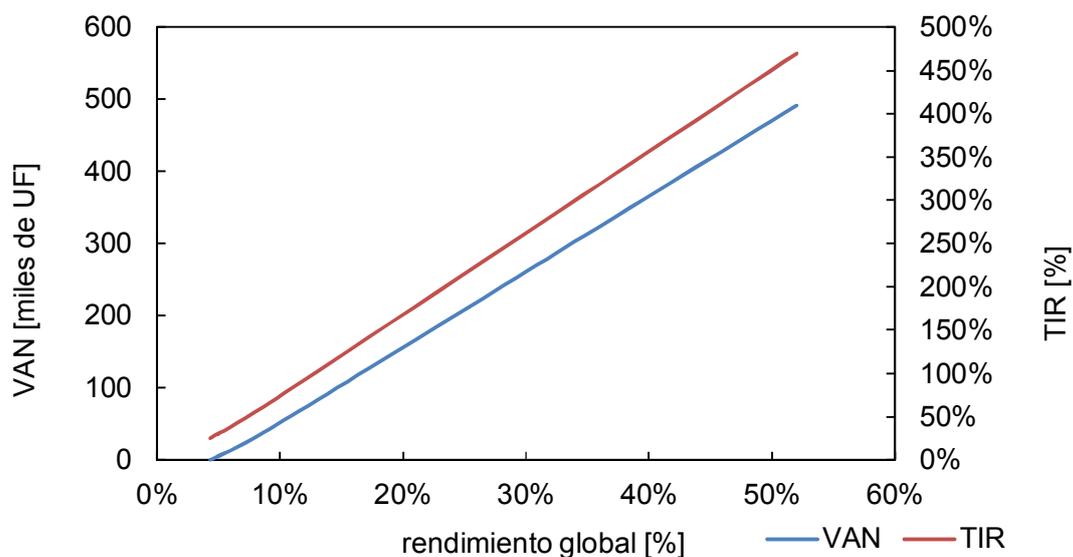


Fig. 7.4 Efecto de la variación del rendimiento de viabilidad celular en el secador

7.4.4 Rendimiento del producto sin etapa de formulación

Con el objetivo de comparar la rentabilidad del proyecto de un producto que se vende en un concentrado líquido sin formulación especial, se estimaron los costos de inversión y de producción, eliminando todos aquellos datos que tuviesen que ver con la etapa de formulación.

Se estudió la variación en el precio de venta del producto y se estimó un precio mínimo de 0,62 [USD/ha] para recuperar el capital al décimo año, a diferencia del precio con formulación que es de 2,2 [USD/ha]. Además se observa que la rentabilidad del proyecto es mucho mayor que para el caso del producto formulado, correspondiendo este último a un 33% del VAN del anterior.

En la Fig. 7.5 se observa el efecto en la variación del precio del producto sin formulación.

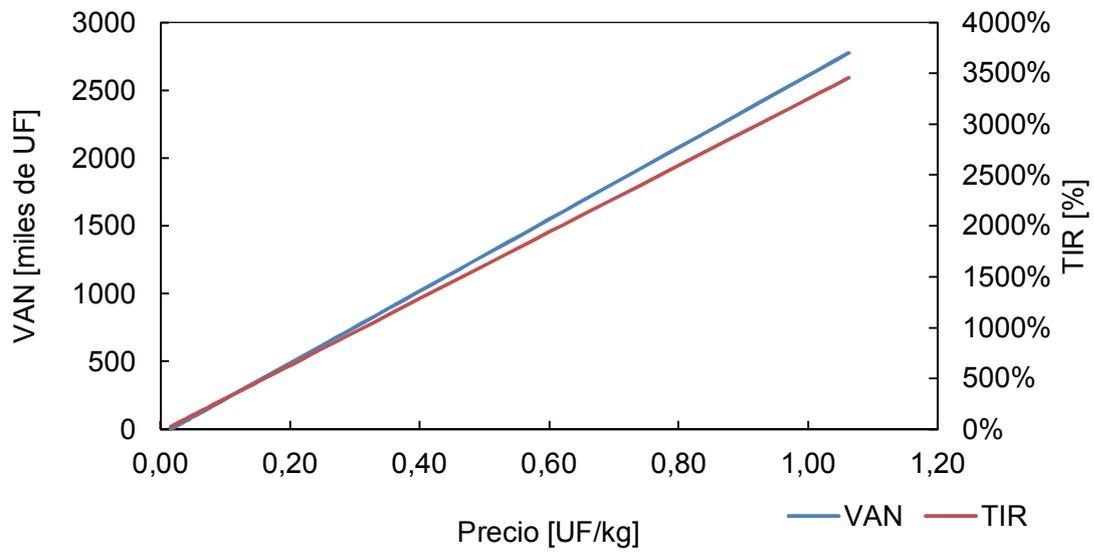


Fig. 7.5 Efecto en la variación del precio del producto sin formulación

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

8.1 DISCUSIÓN

De acuerdo a la revisión realizada, es muy poca la información respecto de las empresas que se dedican a este rubro, por lo que se estima conveniente estudiar de manera más detallada la realidad de producción nacional de bioinoculantes a base de microorganismos y determinar su uso real en el mercado.

Conforme al análisis de datos realizado en el estudio de mercado, cabe mencionar que solo se encontraron antecedentes de importaciones de biofertilizantes; información respecto de la producción nacional fue muy escasa, especialmente en términos numéricos. La obtención de estos datos es fundamental para estimar una capacidad real de planta, de manera de competir con productores nacionales a un nivel semejante de producción e incidencia en el mercado.

La capacidad de la planta debiese ser estimada en función de la demanda nacional de bioinoculantes a base de microorganismos, y no respecto a las posibles hectáreas cultivables como se realizó en este proyecto, ya que puede llevar a la sobreestimación de la capacidad de la planta. El mercado de los bioinoculantes aún es un mercado pequeño y razones como la incertidumbre social y la escepticidad por parte de grandes empresas no permiten que el mercado se agrande. La estimación de un 20% de cobertura puede ser un escenario poco probable de realizar, no por la factibilidad técnica, sino que porque la venta de este tipo de productos aún no se ha masificado y las posibilidades de tener periodos de capacidad inoperantes es bastante probable. De acuerdo a esto, se desea recalcar que los valores obtenidos en el flujo de caja del proyecto estén siendo sobreestimados, ya que una tasa interna de retorno por sobre el 30% no es algo normal y el resultado obtenido supera con creces este valor.

La ubicación de la planta para este proyecto no es un ítem que deba estudiarse en profundidad, ya que de acuerdo al estudio económico, el costo del terreno es despreciable respecto de los

ingresos generados, aun tomando en cuenta que por ejemplo en la RM el costo del terreno puede llegar a superar el doble del costo del terreno de la región seleccionada. De acuerdo a las necesidades de la planta, solo se requiere tener cercanía a las vías de acceso de las materias primas, primordialmente vía importación (barco, avión) y disponibilidad de agua. De acuerdo a las necesidades personales de la empresa es que se podría reubicar la planta sin mayor problema.

De acuerdo a la factibilidad técnica de llevar a cabo este proceso en una planta más bien tipo piloto, se establece que es completamente realizable con los equipos y operaciones seleccionadas. Se debe evaluar la realidad de llevar los parámetros de fermentación desde una escala laboratorio a una piloto, debido a que los datos proporcionados en el capítulo 4 son datos obtenidos de pruebas de laboratorio. Así también es necesario evaluar la posibilidad de utilizar un medio de cultivo distinto al seleccionado, ya que el medio Burk es generalmente un medio de uso de laboratorio y aunque no tenga gran relevancia respecto de los costos de producción y ha presentado buenos resultados a escala industrial, debiesen ser evaluadas otras fuentes de carbono como por ejemplo, desechos agro-industriales o desechos de la industria de alimentos.

Respecto de la presentación final del producto, es necesario evaluar la factibilidad de repartir 11,4 gr de cápsulas en una hectárea y su efecto de biofertilizante en el cultivo deseado. Es muy importante tener en cuenta que trabajar con las unidades de UFC/mL o UFC/g puede que no sea un parámetro muy adecuada ya que un cambio en una unidad de logaritmo puede afectar en gran medida los resultados. Es por esto que los valores deben ser cuidadosamente estimados.

Otros factores como la cantidad de alginato y almidón para la encapsulación o las condiciones de operación o el tipo de secador, son variables muy relevantes para el rendimiento del proceso y debiesen ser constantemente revisadas y evaluadas. Esto, debido a que la factibilidad económica es muy sensible a variaciones en el rendimiento del proceso.

Queda destacar que el proceso puede ser escalable para otro microorganismo, siempre y cuando el microorganismo seleccionado se ajuste a las condiciones de los equipos de proceso.

Suena interesante evaluar la posibilidad de realizar el proceso para otras bacterias o levaduras, de manera de agrandar la gama de productos de la empresa.

8.2 CONCLUSIONES

Se logró disponer de un estudio de mercado que abarcaba tanto microorganismos con función bioinoculante como biocontroladora. De acuerdo a la información recopilada se determinó que el mercado nacional de biofertilizantes es pequeño y con gran potencial de ser explotado en un corto a mediano plazo, por lo que se decidió abarcar un 20% de las potenciales hectáreas cultivables por biofertilizantes. La planta productora de microorganismos operará al primer año con un 70% de su capacidad, la cual será completamente cubierta gradualmente hasta el año 2024.

Se seleccionaron 2 microorganismos, *Azotobacter* y *Azospirillum*, para la formulación de un producto con características biofertilizantes. El proceso de obtención del bioinoculante consiste en 2 etapas: la primera, una serie de fermentaciones tipo batch y la segunda, un innovador proceso de formulación que destaca por su técnica de encapsulamiento con almidón y alginato.

Desde una mirada técnica, es totalmente factible instalar una planta productora de microorganismos con características biofertilizantes a partir de los procesos seleccionados, ya que se cuenta con los equipos necesarios tanto para la parte de producción como de formulación; así también se cuenta con profesionales competentes y apropiados para el completo desarrollo del bioinoculante.

De acuerdo a los estudios realizados, a partir de un precio de venta de 2,2 [USD/ha] el proyecto es económicamente rentable, sin embargo, se decide vender el producto a un precio de 15 [USD/ha], lo que se traduce en un precio de 1.320 [USD/kg]. A partir del primer año, el producto ya se hace viable y rentable con un VAN de 40.855 UF y TIR de un 205%. Respecto del análisis de sensibilidad, se puede concluir que la modificación del precio de venta del producto y el costo de la materia prima, no tienen mayor incidencia en la rentabilidad del

proyecto. La variación del rendimiento de viabilidad celular produce un cambio muy sensible en la rentabilidad del proyecto, ya que un leve aumento o disminución en el rendimiento puede hacer que el proyecto sea o no rentable. Al considerar el proyecto sin etapa de formulación, el proyecto se hace aún más rentable de lo que ya es.

8.3 RECOMENDACIONES

Se propone evaluar la efectividad del producto encapsulado en cultivos que requieran un suministro adicional de fuente de nitrógeno, así como también evaluar la real eficiencia del almidón y alginato en el proceso de liberación de los microorganismos en el suelo

También se recomienda evaluar la viabilidad celular dentro del proceso completo, poniendo énfasis en puntos críticos como la etapa de secado. Para la etapa de secado se sugiere estudiar en detalle el diseño y funcionamiento del equipo seleccionado; de acuerdo a opiniones de expertos, este diseño de secador tipo tambor rotatorio con flujo de aire cruzado sería una opción adecuada para no alterar en gran manera la viabilidad celular. La salida del agua ligada a través de los poros es el paso determinante para la viabilidad celular, por lo que el equipo diseñado proporcionaría un flujo graduado del agua ligada de la cápsula, mejorando los rendimientos de viabilidad celular.

Para estudios futuros, se recomienda evaluar el proceso de producción con otros microorganismos con potencial bioinoculante y/o biocontrolador. Es posible generalizar el proceso en 3 grandes etapas, de manera de usar la misma infraestructura para distintos microorganismos, variando solamente las condiciones de cultivo como pH, temperatura, medio de cultivo, aireación, etc. Se debe evaluar la factibilidad de encapsular otros microorganismos mediante el proceso de encapsulación con almidón-alginato.

Así como se puede indagar en nuevos microorganismos, es posible también investigar y verificar el uso de otros medios encapsulantes, como la quitina y ácidos húmicos, o bien otras técnicas como la floculación natural en aquellos casos que es posible. Además, es necesario

determinar un tamaño adecuado para las cápsulas, lo cual puede influir directamente en la aplicación y distribución del producto en el cultivo.

Por último, con respecto al tratamiento de residuos, a pesar de que la calidad del efluente cumple con el DS N° 609, se recomienda evaluar la posibilidad de tratarlos de forma privada y reutilizar el efluente y los lodos tratados, para el riego y fertilización del recinto donde está ubicada la planta.

CAPÍTULO 9 NOMENCLATURA

Elemento	símbolo	unidades
Aceleración de gravedad	g	[m/s ²]
Actividad de agua	a _w	-
Agua encapsulada	W _E	[kg]
Agua libre	W	[kg]
Alginato de calcio	AgCa	[kg]
Alginato de sodio	AgNa	[kg]
Almidón	Am	[kg]
Altura	H _i	[mm], [cm] o [m]
Ancho baffle	J	[mm], [cm] o [m]
Ancho paleta	W _B	[mm], [cm] o [m]
Ángulo	Θ	[°]
Ángulo	α	[°]
Área	A	[m ²]
Biomasa	B	[g] o [kg]
Calor	Q	[kcal] o [kJ]
Calor específico	C _p	[kcal/kg·°C] o [kJ/kg °C]
Calor latente de vaporización	λ	[kJ/kg]
Coefficiente de convención	h	[kcal/h·m ² ·°C] o [kJ/s m ² °C]
Coefficiente global de transferencia de calor	U	[kcal/h·m ² ·°C]
Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	k _{La}	[h ⁻¹]
Concentración de Biomasa	X	[g/L]
Concentración de oxígeno disuelto	C _L	[mg/L]
Concentración de saturación de oxígeno disuelto	C _L [*]	[mg/L]
Concentración de sustrato	S	[g/L]
Constante de Henry	H	[atm·L/mg]
Constante de proporcionalidad para el cálculo de potencia	k ₁	-
Constante de proporcionalidad para el impulsor de paletas inclinadas	k ₂	-
Corrientes	F	[g] o [kg]
Densidad	ρ	[g/mL] o [kg/L]
Diámetro	D	[mm], [cm] o [m]
Eficiencia	η	-
Eficiencia de absorción de oxígeno	E	[%]

Elemento	símbolo	unidades
Factor	f	[%] o adimensional
Factor sigma	Σ	[pie ²] o [m ²]
Flujo de calor	q	[kcal/h] o [kJ/h]
Flujo volumétrico (Caudal)	C	[L/s] o [L/min] o [m ³ /h]
Grado inclinación	s	°
Grados	°	[en degradianes]
Humedad absoluta	HA	[kg agua/kg aire seco]
Humedad relativa	HR	%
Largo	L	[mm], [cm] o [m]
Masa	M	[mg], [g] o [kg]
Masa de agua por masa de aire seco	Y	[g/g] o [kg/kg]
Masa de Aire	G	[g] o [kg]
Medio de Cultivo	MC	[g] o [kg]
No definido	ND	-
Número	n°	-
Número de alambres de corte	z	-
Número de potencia	Np	-
Número de Reynolds	Re	-
Número de unidades de transferencia	Nt	-
Peso Molecular	PM	[g/g mol]
Porcentaje de oxígeno en el aire alimentado	NO ₂	[%]
Porcentaje de volumen de carga	j	[%]
Porcentaje saturación de oxígeno disuelto	%OD	[%]
Potencia	P _w	[kw] o [Hp]
Presión	P	[atm], [bar] o [psi]
Presión atmosférica	π	[atm], [bar] o [psi]
Radio	R	[mm], [cm] o [m]
Relación Largo/Diámetro	L/D	-
Rendimiento de oxígeno en células	Y _{O2}	[g oxígeno/g biomasa]
Rendimiento sustrato en biomasa	Y _{x/s}	[g biomasa/g sustrato]
Superficie por pie lineal	sppl	[pie ² /pie] o [m ² /m]
Tasa de producción	π	-
Temperatura	T	[°C] o [K]
Temperatura media logarítmica	LMTD	-
Tensión de oxígeno disuelto	TOD	[%]
Tiempo	t	[s], [min], [h], [día] o [año]
Unidad formadora de colonias	UFC	[unidades]

Elemento	símbolo	unidades
Variación consumo sustrato	ΔS	[g/L]
Variación crecimiento biomasa	ΔX	[g/L]
Velocidad	v	[m/s]
Velocidad de consumo de Oxígeno	N_A	[g/L·h]
Velocidad de rotación	N	[rpm], [1/s]
Velocidad de transferencia de oxígeno	V_{TO}	[g/L·h]
Velocidad específica de consumo de oxígeno	q_{O_2}	[mmol/g·h]
Velocidad específica de crecimiento	μ	[h ⁻¹]
Velocidad específica de crecimiento máxima	$\mu_{m\acute{a}x}$	[h ⁻¹]
Viscosidad	μ	[cP] o [Pa·s]
Volumen	V	[mL], [L] o [m ³]

CAPÍTULO 10 REFERENCIAS

- Abou El-Magd, M., Zaki, M., & Abo Sedera, S. (2014). Effect of Bio-Nitrogen as a Partial Alternative to Mineral-nitrogen Fertilizer on Growth, Yield and Head Quality of Broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *Italica*). *World Applied Sciences Journal*, 31(5), 681-691.
- Acevedo, F., Gentina, J., & Illanes, A. (2002). *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica*. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Albrecht, S., Burris, R., & Okon, Y. (1976). Carbon and Ammonia Metabolism of *A. lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 592-597.
- Amorós, D. (2013). *Efecto del almidón en la viabilidad gastrointestinal del Lactobacillus acidophilus en biosoportos de alginato/almidón*. Trabajo final de Máster, Universidad de Oviedo, Departamento de Biotecnología alimentaria, Oviedo.
- ANASAC. (2013). ANASAC, *Agrícola Nacional S.A.C.* Obtenido de http://www.anasac.cl/AGROPECUARIOS/opensite_det_20131001000705.aspx.
- Araujo, Y. M., Díaz, L. J., Rodríguez, F. R., & Pargas, L. (2014). *Efecto del biofertilizante Azotobacter sp. en el cultivo de papa en el estado de Mérida*. Recuperado el 1 de Agosto de 2014, de sitio web del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de Venezuela: http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/congresos/CVCS19/uso_manejo_suelo/UMS1.pdf
- Asesorías Agrícolas y Agroindustriales Ltda. (ASAGRIN). (2010). *Estudio de Diagnóstico de Mercado y Estudio de la Cadena de Comercialización de Fertilizantes en Chile*. Informe Final, Santiago de Chile.
- Aviles, M., Borrero, C., Casanova, E., Segarra, G., & Trillas, I. (2013). Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34. *Phytopathologia Mediterranea*, 77-83.
- Balandreau, J. (1986). Ecological factors and adaptive processes in N₂-fixing bacterial population of the plant environment. *Plant and Soil*, 29, 73pp.
- Barak, R., Henis, Y., Nur, I., & Okon, I. (1982). Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 152, 643-649.

- Bashan, Y. (1986). Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl Environ Microbiol*, 51, 1089-1098.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plants growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729-770.
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB and PGPB. *Soil Biol. Biochem.*, 30(8), 1225-1228.
- Bashan, Y., & Levanony, H. (1990). Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. *CAN. J. MICROBIOL*, 36, 591-608.
- Bashan, Y., Alcaraz-Melendez, L., & Toledo, G. (1992). Responses of soybean and cowpea root membranes to inoculation with Azospirillum brasilense. *Symbiosis*, 13, 217-228.
- Bashan, Y., de Bashan, L. E., Hernández, J. P., Puente, M. E., Bacilio, M., & Leyva, L. A. (2008). Inoculantes microbianos sintéticos: ¿son el futuro? En A. Díaz-Franco, & N. Mayek-Pérez, *La Biofertilización como tecnología sostenible* (págs. 167-186). La Paz, Baja California Sur, México: Plaza y Valdés, S.A. de C.V.
- Bashan, Y., Hernández, J.-P., Leyva, L. A., & Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers. *Biol Fertil Soils*, 35, 359-368.
- Bashan, Y., Trejo, A., & E. de-Bashan, L. (2011). Development of two culture media for mass cultivation of Azospirillum spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biol Fertil Soils*, 47, 963-969.
- Becking, J. H. (2006). The family Azotobacteraceae. En A. Balows, T. G.H., M. Dworkin, H. W., & S. K. H. (Edits.), *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* (Vol. 6, págs. 759–783). New York, USA: Springer.
- Bergey, D. H. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2 ed., Vol. 2). (G. Garrity, Ed.) Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bergey, D., & Breed, R. (1957). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- Bioinsumos Nativa*. (20 de Junio de 2014). Obtenido de <http://www.bionativa.cl>
- Biosim EIRL. (s.f.). *Micorrizas*. Recuperado el Junio de 2014, de sitio web de Biosim EIRL: <http://www.biosim.cl/micorrizas.htm>
- Blandino, A., Macías, M., & Cantero, D. (1999). Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(6), 686-689.

- Bonilla, R., Obando, M., & Rivera, D. (2012). Estandarización de un medio de cultivo a partir de fuentes agroindustriales para la multiplicación de *A. brasilense*. 38-38.
- Borges-Rodríguez, D., San Juan-Rodríguez, A. N., Díaz-LLanes, A. O., Gómez-Santesteban, E., & Hernández-Sánchez, R. (2012). Evaluación de la zeolita como soporte sólido para la formulación del biofertilizante Azospirillum, ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar [en línea]. *Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, España, Portugal (redalyc)*, 46(2).
- Büchi, Labortechnik AG. (s.f.). *Products and solutions: encapsulator B-390*. Recuperado el diciembre de 2014, de Büchi Labortechnik AG web site: <http://www.buchi.com/en/products/spray-drying-and-encapsulation/encapsulator-b-390>
- Burk, D., Horner, C., & Lineweaver, H. (1932). The temperature characteristic of respiration of *Azotobacter*. *The Journal of General Physiology*, 497-505.
- Burris, R., Burpee, C., Del Gallo, M., & Martínez-Drets, G. (1984). Catabolism of Carbohydrates and Organic Acids and Expression of Nitrogenase by *Azospirillum* spp. *Journal of Bacteriology*, 80-85.
- Burris, R., Fu, H., & Hartmann, A. (1988). Influence of Amino Acids on Nitrogen Fixation Ability and Growth of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 87-93.
- Cassán, F., Sgroj, V., Perrig, D., Masciarelli, O., & Luna, V. (2008). Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. En F. Cassán, & I. García de Salamone (Edits.), *Azospirillum* sp.: *Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina* (págs. 61-86). Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Microbiología.
- Cassidy, M., Lee, H., & Trevors, J. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *J Ind Microbiol*, 16, 79-101.
- CCO y FIA. (2008). *Catálogo de insumos utilizados para la nutrición de cultivos en agricultura orgánica disponible en Chile*. Santiago de Chile.
- Ceballo, C. (2012). *Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo a través de bioencapsulados en trigo (Triticum aestivum L.)*. Memoria presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía, Valdivia, Chile.
- Chan, E.-S., Lee, B.-B., Ravindra, P., & Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of calcium-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338, 63-72.

- Chan, E.-S., Wong, S.-L., Lee, P.-P., Lee, J.-S., Ti, T. B., Zhangd, Z., . . . Yim, Z.-H. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83, 225–232.
- Chávarri, M., Marañón, I., & Villarán, M. C. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. En P. E. Rigobelo, *Encapsulation Technology to protect Probiotic Bacteria, Probiotics* (págs. 501-540). Miñano, España.
- Chiang, C., Gerding, M., Doussoulin, M., & Guajardo, C. (2013). TwinN: Bacterias fijadoras de nitrógeno y promotoras del crecimiento vegetal. *RedAgrícola Empresas*, Sept/Oct, 18-19.
- Choi, Y., & Okos, M. (1986). Effects of temperature and composition on the thermal properties of foods. In M. LeMaguer, & P. Jelen, *Food and Process, Analysis, Design and Simulation* (Vol. 1). New York: Elsevier.
- Clua, A., & Oligati, J. B. (2013). Evaluación de la doble inoculación Bradyrhizobium-micorrizas y el uso de fitoterápicos de semilla en el crecimiento, eficiencia de inoculación y el rendimiento de un cultivo de soja. (*RIA*) *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 39(3), 250-258.
- COAGRA. (2012). COAGRA. Obtenido de <https://www.coagra.com/noticias/novedades/bio-insumos-nativa-productos-y-soluciones-organicas-para-una-agricultura-moderna>
- Constantino, M., Gómez, R., Álvarez, J. D., Pat, J. M., & Espín, E. G. (2010). Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices* en el crecimiento y nutrición de plántulas de papaya en fase de vivero. *Agronomía Costarricense*, 35(1), 15-31.
- Cotrisa S.A.; Sofo Temuco. (2014). *Buenos precios para el trigo pero superficie estable*. Recuperado el Junio de 2014, de Noticias Redagrícola: <http://www.redagricola.com/reportajes/cultivos/buenos-precios-para-el-trigo-pero-superficie-estable>
- Cruz, M. (2004). Enfermedades de la Vid en el Secano Interior de la VII y VIII Regiones de Chile. *Boletín INIA n° 111*, 98.
- Cutshall, D. ., Vigil, G., & Westby, C. (1983). Metabolism of Various Carbon Sources by *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 1369-1372.
- Dahm, H. (1993). Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures. *Z. Mikrobiol.*, 148, 195-203.
- Dawes, E., Horan, N., & Jarman, T. (1981). Effects of Carbon Source and Inorganic Phosphate Concentration on the Production of Alginic Acid by a Mutant of *Azotobacter vinelandii*

- and on the Enzymes Involved in its Biosynthesis. *Journal of General Microbiology*, 127, 185-191.
- de Bashan, L. E., Holguin, G., Glick, B., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En A. Alarcón, & R. Ferrata-Cerrato (Edits.), *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biologico, planta-microorganismo* (págs. 170-224). Ciudad de México, México: Trillas.
- Díaz, Á., Altamirano, C., Gutierrez, C., & Martínez, F. (2013). Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* grown at two bioreactor scales under oxygen-limited conditions. *Bioprocess Biosyst Eng*, 8.
- Díaz-Barrera, A., & Soto, E. (2010). Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: Current state, limits and prospects. *African Journal of Biotechnology*, 9(33), 5240-5250.
- DIBICO S.A. DE C.V. MEXICO, D.F. . (2014). *Copyright Probiotek 2014*. Obtenido de <http://www.probiotek.com/producto/caldo-luria-luria-bertani-lb/>
- Dibut, B., & Martínez, R. (2004). Biofertilizantes y bioestimuladores. Métodos de inoculación en Fertilidad y Manejo del Suelo: bases para la Agricultura Orgánica. En V. Autores, *Manual sobre agricultura orgánica sostenible* (págs. 15-21). La Habana: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Recuperado el 8 de Junio de 2014, de Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO): <http://www.fao.org/alc/file/media/pubs/2004/agricultura-organica.pdf>
- Dommergues, Y., Diem, H., & Divies, C. (1979). Polyacrylamideentrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 779-781.
- Donoso, E., Tobar, B., & Jiménez, M. (2011). *Desarrollo tecnológico y adopción de insumos ecológicos: línea base 2010 y prospectiva 2030*.
- Doran, P. (2013). *Bioprocess Engineering Principles* (Segunda ed.). Waltham, Massachusetts, EE.UU.: Academic Press.
- Draget, K., Smidsrod, O., & Skjak-Braek, G. (2005). Alginates from Algae. En A. Steinbüchel, & S. K. Rhee (Edits.), *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, Production and Patents*. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Dreistadt, S. H. (2007). *Biological Control and Natural Enemies*. Obtenido de Agriculture and Natural Resources, University of California: <http://www.ipm.ucdavis.edu/>
- Elmerich, C., Zimmer, W., & Vielle, C. (1992). Associative nitrogen-fixing bacteria. En G. Stacey, R. Burris, & H. Evans (Edits.), *Biological Nitrogen fixation* (págs. 212-258). Nueva York: Chapman and Hall.

- Espinoza, J. A. (2014). *Boletín insumos, información a mayo 2014*. Boletín, Gobierno de Chile, Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (Odepa), Santiago de Chile. Obtenido de http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1405461491Boletininsumos2014061.pdf
- Ezziyani, M., Pérez, C., Requena, M., & Sid, A. (2004). Trichoderma harzianum como biofungicida para el biocontrol de Phytophthora capsici en plantas de pimiento (Capsicum annum L.). *Anales de Biología*, 26, 35-45.
- Fages, J. (1994). Azospirillum inoculants and field experiments. En *Azospirillum/plant associations* (pág. 90).
- FAO. (2002). *Los Fertilizantes y su uso*. Roma.
- Felici, C., Vettori, L., Giraldi, E., Forino, L. M., Toffanin, A., Tagliasacchi, A. M., & Nuti, M. (2008). Single and co-inoculation of Bacillus subtilis and Azospirillum brasilense on Lycopersicon esculentum: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied soil ecology*, 40, 260-270.
- Ferlini, H. A., Díaz, S. C., & Traut, C. O. (2005). *Beneficios del uso de inoculantes sobre la base de azospirillum brasilense*. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Santa Fe, Argentina.
- Fernández, M. T., & Rodríguez, H. (2005). El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (Redalyc)*, 39(3), 27-34.
- Fett, W., Osman, S., Fishman, M., & Siebles, T. (1986). Alginate production by plant-pathogenic pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*, 52, 466-473.
- FIA. (s.f.). *Base de datos nacional de proyectos*. Recuperado el Mayo de 2014, de sitio web Fundación para la Innovación Agraria: <http://www.fia.gob.cl/Resultadobuscador.aspx?Search=biofertilizante>
- Gobierno de Chile. (2014). *Reforma tributaria*. Recuperado el diciembre de 2014, de Reforma tributaria, gobierno de Chile: <http://reformatributaria.gob.cl/>
- Goedas, A. (2010). Las Micorrizas arbusculares como bioinoculantes. En A. varios, M. L. Puente, J. E. García, & A. Perticari (Edits.), *Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo en trigo y maíz* (págs. 53-59). Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Gómez, J. (2000). *Abonos orgánicos*. Colombia.
- Gonzales-López, F., Salmeron, V., Martinez-Toledo, M., Ballesteros, F., & Ramos-Cormenaza, A. (1986). Production of auxins, cytokinins by Azotobacter vinelandii ATCC 12837 in chemically-defined media and dialysed soil media. *Soil.Biol.Biochem*, 18(1), 119-120.

- González, G. (Junio de 2009). *Promotores de crecimiento y terapicos de semillas: buenos aliados a la hora de efectivizar los recursos en la producción de trigo*. Recuperado el mes de Julio de 2014, de sitio web de Rizobacter Argentina S.A.: http://www.rizobacter.com.ar/archivos/ensayos_rizobacter/18_promotores_de_crecimiento_y_terapicos_de_semillas.pdf
- González, J. F., & Hernández, H. (2007). *Encapsulación de Bifidobacterium animalis subsp.lactis en alginato de calcio para su utilización en un alimento seco*. Recuperado el Junio de 2014, de Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_III/Orales/OIII-24.pdf
- Goss, G. B. (2003). Clays as biological carriers. In R. Downe, J. Mueninghoff, & G. Volga, *Pesticide formulations and delivery systems: meeting the challenges of the current crop protection industry*. American Society for Testing and Materials (pp. 24-34). Dallas.
- Greaves. (2014). *Mixing processes: Solubilising*. Recuperado el diciembre de 2014, de Greaves fluid processing solutions: <http://greaves.co.uk/mixers/mixing-processes/>
- Greaves(b). (2014). *mixing processes: Dissolving and dispersing*. Recuperado el diciembre de 2014, de Greaves: fluid processing solutions: <http://greaves.co.uk/mixers/mixing-processes/>
- Green, D., & Perry, R. (2008). *Perry's chemical engineers handbook*. USA: Mc Graw Hill.
- Hae-Sung, K. (1990). A kinetic study on calcium alginate bead formation. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 7(1), 1-6.
- Heinzen, C., Berger, A., & Marison, I. (2004). Use of vibration technology for Jet break-up for encapsulation of cells and liquids in monodisperse microcapsules. En V. Nedović, & R. Willaert, *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology* (págs. 257-276). Bruselas: Springer.
- Hernández, H., & López, G. (2009). *Estudio de la encapsulación de Bifidobacterium animalis subsp. lactis y su uso como probiótico*. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación en Alimentos, México D.F.
- Hernández, Y., Garcia, O. A., & Ramon, M. (2001). Utilización de algunos microorganismos del suelo en cultivos de interés para la ganadería. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola [en línea]*, 35(2). Recuperado el 31 de julio de 2014, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193018220001>> ISSN 0034-7485

- Higa, T., & Parr, J. (1994). *Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment*. International Nature Farming Research Center, Atami, Japón.
- Himedia. (2014). *Molecular Biology Growth Media, Burk Media*. Recuperado el mes de Junio de 2014, de Himedia web site: <http://www.himediastore.com/HiMedia-Burk%C2%92s-Medium/dp/B00I9ZC1NW>
- Iavnova, E., Teunou, E., & Poncelet, D. (2006). Alginate based macrocapsules as inoculant carriers for the production of nitrogen fixing bio fertilizers. *Chemical industry & chemical engineering quarterly (CI&CEQ)*, 12(1), 31-39.
- Instituto Nacional de Estadísticas (INE). (2013). *Agropecuarias, Informe Anual*.
- Ivanova, E., Teunou, E., & Poncelet, D. (2006). Alginate based macrocapsules as inoculant carriers for the production of nitrogen fixing bio fertilizers. *Chemical industry & chemical engineering quarterly (CI&CEQ)*, 12(1), 31-39.
- Jacquot, M., & Perneti, M. (2004). Processes, Spray coating and Drying. En V. Nedovié, & R. Willaert, *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*. Bruselas: Springer.
- Jiménez, D. J., Montaña, J. S., & Martínez, M. M. (2011). Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 846-858.
- Joe, M. M., Karthikeyan, B., Chauhan, P. S., Shagol, C., Islam, M. R., Deiveekasundarama, M., & Sa, T. (2012). Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. *European Journal of Soil Biology*, 50, 198-206.
- Kern, D. (2006). *Procesos de transferencia de calor*. México: Compañía Editorial Continental.
- Kusey, R., Jansen, H., & Legget, M. (1989). Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *Adv.Agron.*, 199-223.
- Lamm, R., & Neyra, C. (1981). Characterisation and cyst production of *Azospirillum* isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. *Can. J. Microbiol*, 27, 1320-1325.
- Lee, P., & Rogers, M. (2012). Effect of calcium source and exposure-time on basic caviar spherification. *International Journal Gastronomy and Food Science*, 96-100.
- Madriz, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo integrado de Plagas*(63), 22-32.
- Malavolta, V., Rodrigues, J., & Victor, O. (1986). Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*(12), 16pp.

- Malusá, E., & Sas-Paszt, L. C. (2012). Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula used as Biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 1-12.
- Mapleton Agri Biotec. (s.f.). *TwinN yield increasing microbes: potato trials booklet*. Recuperado el 1 de Agosto de 2014, de Mapleton Agri Biotec Pty Ltd Web site: http://www.mabiotec.com/pdf/100906_FINAL_Potato-Trials-Booklet_LR.pdf
- Mapleton Agri Biotec. (s.f.). *TwinN yield increasing microbes: Tree Crops*. Recuperado el 1 de Agosto de 2014, de Mapleton Agri Biotec Pty Ltd Web site: http://www.mabiotec.com/pdf/110704_TwinN-in-Tree-Crops_LR.pdf
- Marison, I., Peters, A., & Heinzen, C. (2004). Liquid core capsules for applications in biotechnology. En V. Nedovié, & R. Willaert (Edits.), *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology* (pág. 189). Bruselas: Springer.
- Martín, A., & Sánchez, T. (1997). *España Patente nº 2093559*.
- Ministerio de obras Públicas (MOP). (2012). *Estrategia Nacional de Recursos hídricos*. Santiago, Chile.
- Mujumdar, A. S. (2006). *Handbook of industrial Drying*. Singapore: Taylor and Francis Group LLC.
- Naderifar, M., & Daneshian, J. (2012). Effect of different nitrogen and biofertilizers effect on growth and yield of Brassica napus L. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(8), 478-482.
- Núñez, C., León, R., Guzmán, J., Espín, G., & Soberón-Chavez, G. (2000). Role of Azotobacter vinelandii mucA and mucC gene products in alginate production. *J Bacteriol*, 182, 6550–6556.
- Nussinovitch, A. (2010). *Polymer Macro- and Micro-Gel Beads: Fundamentals and Applications*. Springer.
- Occidental Chemical Chile Limitada. (2007). *Manual Cloruro de Calcio*. Recuperado el noviembre de 2014, de sitio web de Oxychile: http://www.oxychile.cl/opensite_20075.aspx?gln_url_nodo=opensite_det_20080124164651%2Easpx
- ODEPA. (2014 a). *Rubro Cereales*. Recuperado el Junio de 2014, de sitio web de ODEPA: <http://www.odepa.cl/rubro/cereales/>
- ODEPA. (2014 b). *Rubro Cultivos Industriales*. Recuperado el Agosto de 2014, de sitio web de ODEPA: <http://www.odepa.cl/rubro/cultivos-industriales/>
- ODEPA. (2014 c). *Rubro Frutas Frescas*. Recuperado el Agosto de 2014, de sitio web de ODEPA: <http://www.odepa.cl/rubro/frutas-frescas/>

- ODEPA. (2014 d). *Rubro Hortalizas Frescas*. Recuperado el Agosto de 2014, de sitio web de ODEPA: <http://www.odepa.cl/rubro/hortalizas-frescas/>
- Okon, Y. (1985). Azospirillum as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnology*, 3(9), 223-228.
- Okon, Y., & Itzigsohn, R. (1992). Poly-b-hydroxybutirate metabolism in Azospirillum brasilense and the ecological role of PHB in the rhizosphere,. *Microbiol Lett.*, 103, 131-139.
- Pallo, Y. E. (2011). *Evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de Azospirillum spp. aplicable al cultivo de maíz (Zea maysL.)*. Trabajo de Investigación, Requisito Previo a la Obtención del título de Ingeniera Bioquímica, Ambato, Ecuador.
- Parada, M. (2011). *Fertilizantes biológicos en Iberoamérica, situación real y expectativas*. Recuperado el Mayo de 2014, de Humus Origen: <http://www.humus-origen.cl/descargas/documentos/documentos-tecnicos/biofertilizantes-en-iberomerica-en-word-27-de-julio-Maribel-Parada.pdf>
- Parada, M., Reyes, M., & Mera, M. (2007). Situación silvoagropecuaria en Chile y el uso de biofertilizantes. En BIOFAG, *Biofertilizantes en Iberoamérica, una visión técnica, científica y empresarial* (págs. 32-37).
- Paul, E., & Clark, F. (1989). Phosphorus transformation in soil. En E. Paul, & F. Clark, *Soil Microbiology and Biochemistry* (págs. 222-232). Nueva York: Marcel Dekker Inc.
- Peña, C., Campos, N., & Galindo, E. (1997). Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of Azotobacter vinelandii cultured in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol*, 510-515.
- Peña, C., Galindo, E., & Büchs, J. (2011). The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by Azotobacter vinelandii in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Process Biochemistry*, 46, 290-297.
- Peña, C., Trujillo-Roldán, M., & Galindo, E. (2000). Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of Azotobacter vinelandii. *Enzyme Microb Technol.*, 27, 390-398.
- Peters, M. S., Timmerhaus, K. D., & West, R. E. (2003). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. Nueva York: McGraw-Hill.
- Prüsse, U., & Vorlop, K.-D. (2004). The JetCutting Technology. En V. Nedovic, & R. Willaert, *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology* (págs. 295-308). Bruselas: Springer.

- Prüsse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., . . . others. (2008). Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers*, 62(4), 364-374.
- Prüsse, U., Jahnz, U., Wittlich, P., & Vorlop, K. D. (2003). Scale up of the JetCutter technology. *Chem. Ind.*, 57(12), 636-640.
- Puente, M. L., & García, J. E. (2010). Revisión del uso de Azospirillum brasilense como promotor del crecimiento en trigo y maíz en Argentina. En A. varios, M. L. Puente, J. E. García, & A. Peticari (Edits.), *Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo en trigo y maíz* (págs. 9-21). Buenos Aires.
- Rai, S., & Gaur, A. (1998). Characterization of Azotobacter Spp. And effect of Azospirillum lipoferum on the yield and N-Uptake of wheat crop. *Plant and Soil*, 109, 131-134.
- Ramírez, C., Millon, C., Nuñez, H., Pinto, M., Valencia, P., Acevedo, C., & Simpson, R. (2014). Study of effect of sodium alginate on potato starch digestibility during in vitro digestion. *Food Hydrocolloids*, accepted manuscript.
- Ramm, R. (2014). *Fin del bromuro de metilo y uso de portainjertos y productos más 'verdes': Tendencias de la horticultura en Quillota*. Recuperado el Agosto de 2014, de sitio web de Redagícola: <http://www.redagricola.com/reportajes/hortalizas/fin-del-bromuro-de-metilo-y-uso-de-portainjertos-y-productos-mas-verdes-tenden>
- Red BIOFAG. (Noviembre de 2008). *Normativa Iberoamericana para Inoculantes Formulados con Bacterias Rizosféricas Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)*. Recuperado el mes de Julio de 2014, de sitio web de Red Iberoamericana de Fertilizantes Biológicos para la Agricultura y el Medio Ambiente: <https://biofag.org.ar/documentos/RecomendacionesNormativaInoculantes-BIOFAG.pdf>
- Reineccius, G. (1991). Off-flavors in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 29, 381-402.
- Rivera, M. (2008). Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en A. brasilense C16. *Universidad Francisco de Paula Santander*, 92pp.
- Rodriguez H., J. (diciembre de 2014). comunicación personal. *Gerente de Ingeniería y director de Inning Group*, www.inning.cl. Viña del Mar, Chile.
- Rojan, J., Tyagi, R., Brar, S., Surampalli, R., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural. *Critical Reviews in Biotechnology, Informa Healthcare USA, Inc.*, 31(3), 211–226.

- Rojas, A., Holguin, G., Glick, B., & Bashan, Y. (2001). Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* (35), 181-187.
- Rose, M., Deaker, R., Potard, S., Thi Tran, C., Vu, N., & Kennedy, I. (2011). The survival of plant growth promoting microorganisms in peat inoculant as measured by selective plate counting and enzyme-linked immunoassay. *World J Microbiol Biotechnol*, 27, 1649-1659.
- Rubio, E. J., & Petricari, A. (2010). Empleo de *Azotobacter* como inoculante en cultivos extensivos. En A. Varios, M. L. Puente, J. E. García, & A. Petricari (Edits.), *Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo de trigo y maíz* (págs. 61-65). Buenos Aires.
- SAG. (2013). *Agricultura Orgánica Nacional*. Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero, División de protección de Recursos Naturales Renovables.
- SAG. (16 de Junio de 2014). Recuperado el 2014
- Saribay, G. (2003). Growth and dynamic nitrogen fixation dynamics of *Azotobacter chroococcum* nitrogen-free and own containing medium. *Tesis de maestría en ciencias aplicadas*, 1-45.
- Schoebitz, M., Ceballos, C., & Ciampi, L. (2013). Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(1), 1-10.
- Schoebitz, M., López, M. D., & Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agron.Sustain.Dev.*, 33, 751-765.
- Schoebitz, M., Simonin, H., & Poncelet, D. (2012). Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. *Journal of Microencapsulation*, 29(6), 532-538.
- Servicio Nacional de Aduanas de Chile. (31 de julio de 2014). *Información estadística de comercio exterior*. Recuperado el diciembre de 2014, de sitio web del Servicio Nacional de Aduanas de Chile: <http://estacomex.aduana.cl/estacomex/asp/index.asp>
- Servicio Nacional de Aduanas de Chile. (s.f.). *Preguntas frecuentes importaciones*. Recuperado el diciembre de 2014, de sitio web del Servicio Nacional de Aduanas de Chile: http://www.aduana.cl/importaciones-de-productos/aduana/2007-02-28/161116.html#vtxt_cuerpo_T1
- Shrimant, B. (2012). Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *International Journal of Microbiological Research*, 3(1), 46-52.

- Sigma-Aldrich. (20 de Noviembre de 2014a). *Sigma-Aldrich*. Obtenido de Alginic acid sodium salt from brown algae suitable for immobilization of micro-organisms: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/71238?lang=es®ion=CL>
- Sigma-Aldrich. (19 de Noviembre de 2014b). *Sigma-Aldrich*. Obtenido de Starch from potato.
- SII. (2003). *Nueva tabla de vida útil de los bienes físicos del activo inmovilizado*. Recuperado el diciembre de 2014, de sitio web de Servicio de Impuestos Internos de Chile: http://www.sii.cl/pagina/valores/bienes/tabla_vida_enero.htm
- Singh, B., Sharma, D., & Gupta, A. (2009). A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch–alginate. *Journal of Hazardous Materials*, 208-216.
- Smith, R. (1992). Legume inoculant formulation and application (Review). *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 485-492.
- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). Azospirillum, a free-living nitrogenfixing bacteria associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol.*, 24, 487-506.
- Stephens, J., & Rask, H. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Res*, 65, 249-258.
- Tal, Y., van Rijn, J., & Nussinovitch, A. (1997). Improvement of structural and mechanical properties of denitrifying alginate beads by freeze-drying. *Biotechnology Progress*, 13(6), 788-793.
- Tang, M. (1995). Efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en la germinación y la altura de las plántulas en dos leguminosas y dos gramíneas. *Pastos y forrajes*, 18(2), 145-150.
- Tejeda, A., Montesinos, R. M., & Guzmán, R. (1995). *Bioseparaciones*. Sonora, México: Unison.
- Tejera, N., Lluch, C., Martínez-Toledo, M., & González-López, J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*, 270, 223-232.
- Universidad de Chile. (2010). *Informe País. Estado del Medio Ambiente en Chile 2008*. Santiago: U. de Chile.
- van't Land, C. (1991). *Industrial Drying Equipment Selection and Application*. New York: Marcel Dekker.
- Vassilev, N., Toro, M., Vassileva, M., Azcon, R., & Barea, J. (1997). Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. *Bioresour Technol* 29–32, 61, 29–32.

- Villaverde Fernández, M., Fernández Martínez, A., Nicolás Martínez, J. A., Malo López-Román, J., Streintenberger, S., García Gómez, A., . . . Martínez Ortiz, P. (2005). *España Patente nº ES 2234417A1*.
- Vital, L., & Mendoza, A. (2014). Azospirillum: habitante de la gramíneas. *La Ciencia y el Hombre*, 27(2), Revista digital s.p.
- Young, C.-C., Rekha, P., Lai, W.-A., & Arun, A. (2006). Encapsulation of Plant Growth-Promoting Bacteria in Alginate Beads Enriched With Humic Acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(1), 76-83.
- Zohar-Perez, C., Chet, I., & Nussinovitch, A. (2005). Mutual relationships between soils and biological carrier systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(1), 54-60.

CAPÍTULO 11 APÉNDICES

APÉNDICE A ESTUDIO DE MERCADO.....	212
APÉNDICE B SÍNTESIS Y SELECCIÓN DE PROCESOS	225
APÉNDICE C BALANCE DE MASA Y ENERGÍA	229
APÉNDICE D DISEÑO DE EQUIPOS Y EVALUACIÓN ECONOMICA	230
APÉNDICE E PATENTES	237

APÉNDICE A ESTUDIO DE MERCADO

Tabla. A.1 Patentes que involucran Biocontroladores registradas con país de origen solicitante Chile

N° solicitud o de patente	Título	Solicitante	Aplicación	Año registro
44776	FORMULACIÓN CAPSULAR GRANULADA, QUE COMPRENDE MICROORGANISMOS, TIERRA DE DIATOMEAS, OSMOPROTECTANTE, PRECURSORES DE ANTAGONISTAS A PATÓGENOS VEGETALES, Y UNA CUBIERTA DE ALGINATO COAGULADO; MÉTODOS DE PREPARACIÓN; Y SU USO COMO BIOCIDA PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE PATÓGENOS VEGETALES O PARA AUMENTAR LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO	LUIGI CIAMPI PANNO	Bioplaguicida / Bioestimulante	2009
46510	COMPOSICIÓN ARTROPODICA CONCENTRADA EN SUSPENSIÓN BASADA EN UNA CARBOXAMIDA ARTROPODICA, UN VEHÍCULO LÍQUIDO INMISCIBLE EN AGUA, UN ESPESANTE DE SÍLICE, UN SOLVENTE PROTICO Y UN ÁCIDO CARBOXÍLICO SOLUBLE EN AGUA Y ALTERNATIVAMENTE OTRO AGENTE BIOLÓGICO Y/O UN EMULSIFICANTE; Y MÉTODO PARA CONTROLAR UNA PLAGA DE ARTRÓPODOS	DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY	Insecticida	2010
46402	COMPOSICIÓN BACTERICIDA, BACTERIOSTÁTICA Y FUNGICIDA QUE COMPRENDE DOS O MÁS ESPECIES VIVAS DE TRICHODERMA Y UN EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE RUBUS SP; USO DE LA COMPOSICIÓN PARA PROTEGER PLANTAS, SUELOS, SEMILLAS, ARBOLES Y/O FRUTOS CONTRA EL DAÑO DE INSECTOS, BACTERIAS, HONGOS O VIRUS Y PROCEDIMIENTO PARA PREPARARLA.	MARIO REYES SALINAS; JUAN RENCORET HOLLEY	Fungicida	2010

Tabla. A.2 Principales productos Biocontroladores importados

Nombre Comercial	Organismo Activo	Fabricante	País Fabricante	Formulación	Descripción	Principales Cultivos de aplicación	Dosis (kg/ha) / *(L/ha)	Precio de importación promedio por hectárea (US\$ CIF/ha)*
Dipel WG	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Valent BioScienciences Corporation	USA	Gránulos dispersables	Insecticida Biológico a base de <i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie Kurstakis. De origen natural, específico para el control de larvas de lepidópteros, que atacan frutales y viñas, cultivos, hortalizas, praderas, plantas forestales y ornamentales.	Tomates, melón, crucíferas, coliflor, repollo, brócoli, bruselas, tabaco.	0,35 - 1	15,7
Serenade 13,68 SC	<i>Bacillus subtilis</i>	AgraQuest de México S.A. de C.V./ AgraQuest Inc.	México/ USA	Suspensión concentrada	Fungicida biológico, preventivo de amplio espectro para el control de enfermedades como botritis, oidio, venturia, etc.		4 -18	145,4
Serenade MAX	<i>Bacillus subtilis</i>	AgraQuest de México S.A. de C.V./ AgraQuest Inc.	México/ USA	Polvo mojable	Fungicida biológico, preventivo de amplio espectro para el control de las enfermedades como botritis, oidio, pudrición acida, venturia y otros.	Vides, manzanas, frutillas, arándanos, frambuesos	2,5 - 4	83,5

Nombre Comercial	Organismo Activo	Fabricante	País Fabricante	Formulación	Descripción	Principales Cultivos de aplicación	Dosis (kg/ha) / *(L/ha)	Precio de importación promedio por hectárea (US\$ CIF/ha)*
Serenade 10 WP	<i>Bacillus subtilis</i>	AgraQuest de México S.A. de C.V. / AgraQuest Inc.	México/ USA	Polvo mojable	Es un biofungicida preventivo de amplio espectro para el control de Botritis, Oidio y Pudrición Ácida en Vides, para el control preventivo mohoso y botritis calcinal en manzanos.	Vides, manzanoz, frutillas.	5-8	90,1
Javelin WG	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CERTIS	USA	Gránulos dispersables	Insecticida biológico de acción por ingestión (estomacal), formulado a base de una nueva cepa de B. thuringiensis. Control específico de larvas de lepidópteros.	Tomate, papa, repollo brócoli, tabaco, alfalfa, maíz, manzano, peral, duraznero, vides, kiwi, arándano, frutilla.	0,35 - 1	20,1

*Calculado considerando 2 aplicaciones por hectárea

Tabla. A.3 Patentes que involucran Biofertilizantes registradas con país de origen solicitante Chile

N° solicitud o de patente	Título	Solicitante	Aplicación	Año publicación / registro	Estado
200300409	RODUCTO BIOTECNOLOGICO PARA EL TRATAMIENTO DE FERTILIZACION Y RESTAURACION DE SUELOS QUE COMPRENDE UN CONSORCIO DE MICROORGANISMOS CEPAS DE MICROORGANISMOS AZOBACTER SP., AZOSPIRILLUM SP., NITROBACTER SP., NITROSOMONAS SP., PSEUDOMONAS SP., ACINETOBACTER SP., ARTHROBACTER SP., Y SACCHAROMYCES SP	DESARROLLOS BIOTECNOLOGICOS BIOPACIFIC LTDA	Fertilizante, bioestimulante y/o biocontrolador	2011 / 0	Sin Resolver
201001335	PROCEDIMIENTO PARA OBTENER FERTILIZANTE, BIOESTIMULANTE Y/O BIOCONTROLADOR QUE COMPRENDE CULTIVAR UN MICROORGANISMO EN UNA CELULA DE CULTIVO CON UN SUSTRATO, PRODUCIR PROPAGULOS EN FORMA DE POLVO MOJABLE Y MEZCLAR CON FERTILIZANTES ORGANICOS; FERTILIZANTE ORGANICO BIOESTIMULANTE QUE COMPRENDE MICROORGANISMOS Y SU USO	BECKER UNDERWOOD INC	Inoculante , biofertilizante	2007 / 0	Denegada
200000691	FORMULACION CAPSULAR GRANULADA, QUE COMPRENDE MICROORGANISMOS, TIERRA DE DIATOMEAS, OSMOPROTECTANTE, PRECURSORES DE ANTAGONISTAS A PATOGENOS VEGETALES, Y UNA CUBIERTA DE ALGINATO COAGULADO; METODOS DE PREPARACION; Y SU USO COMO BIOCIDA PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE PATOGENOS VEGETALES O PARA AUMENTAR LA FIJACION DE NITROGENO.	ECOTECNOS LTDA.	Fertilización y recuperación de suelos	2004 / 0	Denegada
200701841/44776	MÉTODO PARA TRATAR SEMILLAS QUE COMPRENDE APLICAR UN INOCULANTE LÍQUIDO PARCIALMENTE DESECADO QUE COMPRENDE UNA BACTERIA CULTIVADA A UNA FASE SUSTANCIALMENTE ESTACIONARIA	LUIGI CIAMPI PANNO	Biocontrolador, biofertilizante	2000 / 2009	Concedida
199401106	PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN INOCULANTE PURO DE HONGOS HECTOMICORRICICOS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCION DE ESPECIESFORESTALES	SONIA BEATRIZ GONZALEZ Y LUCIA ALCIRA JORDA,	Hongos micorríticos	1995 / 0	Desistida

Tabla. A.4 Bioinoculantes producidos en Chile

Nombre Comercial	Ingrediente Activo	Fabricante	Tipo de Insumo	Formulación /Presentación	Descripción	Principales cultivos	Dosis de aplicación
Raizfort-M	<i>Micorrizas arbusculares</i>	Iona Chile	Biofertilizante	Sólido / 1 kg	Se presenta como biocontrolador pero en sus indicaciones señala que se aplica para la nutrición y bioestimulación de las plantas.	Amplia gama de cultivos como hortalizas, frutales, especies forestales y floricultura	1/5 del sustrato utilizado normalmente en el caso de semillas vitroplantas o esquejas
RV-2-Biocontrolador	<i>Bacterias y actinomicetos</i>	Sociedad Agrícola Terragénesis	Para devolver el componente biótico a los suelos	Líquido	Estimula el crecimiento vegetal, por la producción de fitohormonas, solubiliza nutrientes, acondiciona pH del suelo, mejora estructura y estabilidad de los agregados del suelo, mineraliza materia orgánica y acelera proceso de degradación	No especifica	2 aplicaciones de 20 L/ha
Biomongen	<i>Trichoderma spp. y Bacillus spp.</i>	Bioinsumos Nativa Ltda.	Estimulante biológico	Líquido concentrado / 300mL	Sin modificación genética. Soporte a base de arcillas con alta capacidad de intercambio catiónico	Trigo y maiz	300mL/100kg de semillas y 300mL /ha en segunda aplicación

Nombre Comercial	Ingrediente Activo	Fabricante	Tipo de Insumo	Formulación /Presentación	Descripción	Principales cultivos	Dosis de aplicación
Rizofix LV	<i>Bacterias del género Rhizobium</i>	Biogram	Biofertilizante	Líquido (200ml) o Polvo (200gr)	Alta eficiencia en la fijación de nitrógeno	Leguminosas	200 gr para: 50 kg de leguminosas de grano, 30 kg de semilla de soya y 25 kg de leguminosas forrajeras
A5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>L. plantarum</i>	Avance Biotechnologies	Microfertilizante ionico	Líquido / 5 L	Actua como atrayente de abejas, mejorador de cuaja, bioinsecticida, repelente y disuador por cambio de medio	Frutales y hortofrutícolas	5 L /ha
Biotaforte	<i>Microorganismos nativos</i>	Biopacific	Bioestimulante	No especifica	Producto que aún no sale al mercado. Estudios indican que supera en promedio un 60% la producción de tomates por planta en relación a un tratamiento control y genera una producción de tomates mayor a un 15% en comparación con lo obtenido al utilizar un producto ecológico análogo	Tomate	No especifica

Nombre Comercial	Ingrediente Activo	Fabricante	Tipo de Insumo	Formulación /Presentación	Descripción	Principales cultivos	Dosis de aplicación
Fertibact	<i>Azotobacter sp.</i> , <i>Azospirillum sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Pseudomona sp.</i> , <i>Nitrosomona sp.</i> , <i>Nitrobacter sp.</i> y <i>Sacharomyces sp.</i>	Ecotecnos Ltda./Biotecnos Ltda.	Bio- fertilizante, inoculante biológico	Líquido / 1, 5,10 y 20 L	Bacterias y levaduras benéficas para el suelo que actúan mejorando el suelo agrícola con actividades nitrificantes, celulíticas, proteolíticas, fosfolubizadoras y promotoras del desarrollo y crecimiento radicular.	Diversos cultivos con distintas dosis de aplicación. Rendimiento promedio de 1 L/ha.	1 L/ ha

*Calculado considerando 2 aplicaciones por hectárea

Tabla. A.5 Proyectos de investigación en base de datos nacional FIA

Año inicio	Año término	Título	Investigador principal	Instituciones asociadas	Tema	Fuente Financiamiento	Objetivo
2011	En ejecución	Tratamiento Anaeróbico de Biomasa Orgánica con Biofilm Celulósico para Producción de Biogás Enriquecido y Biofertilizante Carbonado	José Fernando Reyes Aroca, Universidad de Concepción	Sin información	Sin información	FONDEF	Generar biogás usando biomasa orgánica y animal con co-sustrato celulósico suspendido para aumentar los rendimientos de metano y disminuir los costos de inversión y proceso
2012	2015	Generación de un biofertilizante mediante el uso de genómica y microencapsulación para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile	Véronique Amiard, Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola CGNA	Núcleo Científico Tecnológico de Biorecursos (BIOREN) de la Universidad de La Frontera, Confederación Nacional de Federaciones de Cooperativas y Asociaciones Silvoagropecuarias Chilenas (CAMPOCOOP) y BioMar Chile	Bioteología, Suelos y fertilidad	FIA	Generar un biofertilizante para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino amarillo de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile

Año inicio	Año término	Título	Investigador principal	Instituciones asociadas	Tema	Fuente Financiamiento	Objetivo
2012	2015	Desarrollo de biofertilizantes y creación de Planta Piloto de Producción	Ródulo Rodón, Agrícola, Forestal y Comercial Ródulo Enrique Rodón (BIOAGROTEC EIRL)	Sin información	Sustentabilidad y Producción limpia	FIA	Implementar una planta piloto para la producción masiva de bacterias solubilizadoras de fósforo, que permita la formulación de un producto microbiano de fosfobacterias autóctonas de las regiones del centro y sur de Chile con carácter comercial de uso agrícola y forestal.
2010	2012	Nuevos Biofertilizantes Psicrófilos	Manuel Gidekel, VentureL@b, Universidad Adolfo Ibáñez	VentureL@b, Universidad Adolfo Ibáñez, Uxmal S.A. y Universidad de La Frontera	Agricultura orgánica y agroecológica	INNOVA CHILE	Empaquetar la tecnología para producir un nuevo biofertilizantes psicrófilo en base a bacterias antárticas
1998	2002	Desarrollo de Biofertilizantes para el Cultivo de Arroz en Chile	Iris Pereira Riquelme, Universidad de Talca	Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Quilamapu	Agroindustria y Tecnología de los Alimentos	FIA	Desarrollar y evaluar biofertilizantes para el cultivo de arroz, en base a microalgas fijadoras de nitrógeno. Desarrollar y transferir paquetes tecnológicos compatibles con el uso de biofertilizantes en arroz.

Tabla. A.6 Principales Bioinoculantes importados

Nombre Comercial	Organismo Activo	Fabricante	País Fabricante	Formulación	Descripción	Principales Cultivos de aplicación	Dosis (kg/ha)	Precio de importación promedio por hectárea (US\$ CIF/ha)*
TwinN	<i>Azotobacter spp.</i> , <i>Azospirillum spp.</i>	Mapleton Agri Biotec Pty Ltd	Australia	Liofilizado	Es un fertilizante biológico desarrollado en base a bacterias fijadoras de nitrógeno, seleccionadas por eficacia y presentadas en una formulación liofilizada de última generación.	Cereales, Maíz, Praderas, Frutales, Uva de mesa, Vides viníferas, Olivos	0,0008	2,2
SoilBuilder	<i>Acidovorax facilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. lentimorbus</i> , <i>B. marinus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Cellulomonas fimi</i> , <i>C. flavigena</i> , <i>Rhodococcus rhodochromus</i> .	Agricent para Loveland Products Company	USA	Solución Concentrada	Enmienda en base a microorganismos benéficos de suelo, que permite que la planta aproveche de forma más eficiente fertilizantes orgánicos e inorgánicos.	Frutales, hortalizas y cereales	20-30	99,9

Nombre Comercial	Organismo Activo	Fabricante	País Fabricante	Formulación	Descripción	Principales Cultivos de aplicación	Dosis (kg/ha)	Precio de importación promedio por hectárea (US\$ CIF/ha)*
RhizoFlo	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Becker Underwood	USA	Pellets en base a turba	Inoculante en base a bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno con soporte en base a turba, peletizado para mejor integridad. Las partículas se mantienen intactas aun al pasar por la sembradora	Soya	7,3	61,0
Oiko Bac - 174	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Nocardia corallina</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Ecological Resources, Inc.	USA	Polvo	Es un complejo de microorganismos propios del suelo que permite conseguir diversos efectos a nivel del suelo, como recuperación todo tipo de residuos orgánicos, de la actividad biológica (revitalización) y descomposición de materia orgánica (compostaje) de incluso los muy altos en celulosas y lignina (aserrín).	Revitalización de suelos y Compostaje	1	95,7

Nombre Comercial	Organismo Activo	Fabricante	País Fabricante	Formulación	Descripción	Principales Cultivos de aplicación	Dosis (kg/ha)	Precio de importación promedio por hectárea (US\$ CIF/ha)*
Ecoterra WG	<i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Pseudomona aureofaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> & <i>Bacillus Megaterium</i>	Live Systems Technology S.A.	Colombia	Gránulos dispersables (WP)	Fijación biológica de nitrógeno, solubilización del fósforo insoluble presente en el suelo, producción de sustancias fisiológicamente activas.	Flores, frutales, hortalizas, tratamiento de semillas, plantas aromáticas	0,5-1	121,0
Oiko Riza E*	<i>Endomicorrizas: Glomus Brasilianum</i> , <i>G. Clarum</i> , <i>G. Deserticola</i> , <i>G. Mosseae</i> , <i>G. Intraradices</i> , <i>G. Monosporus</i> y <i>Giaspora margarita</i>	Ecological Resources, Inc.	USA	Polvo	Es un producto de extraordinaria versatilidad para la inoculación de toda clase de cultivos susceptibles a la actividad de las endomicorrizas. Contiene 7 especies de Microrrizas arbusculares.	Uva de Mesa, Vinífera, Paltos, Cítricos, Frutales, Hortalizas, Arándanos, Frambuesas, Frutillas, Papas, Praderas, Cereales, como: Maíz, Trigo, Avena y Raps etc.	1	106,6

Nombre Comercial	Organismo Activo	Fabricante	País Fabricante	Formulación	Descripción	Principales Cultivos de aplicación	Dosis (kg/ha)	Precio de importación promedio por hectárea (US\$ CIF/ha)*
Biohealth	<i>Bacillus subtilis</i> , extracto de Algas (<i>Ascophillum nodosum</i>), Ácidos Húmicos (derivados de Leonardita)	Humintech GmbH	Alemania	Gránulos solubles en agua.	Mejora las condiciones físico-químicas de los suelos, tales como humedad aprovechable para el cultivo (HAA), capacidad de intercambio Cationico (CIC) e incremento de macroporos, permitiendo el ingreso de agua y aire al perfil del suelo.	Hortalizas, Berries, viveros frutales y forestales, frutales, vides viníferas, ornamentales, cultivos extensivos y praderas	4-6	65,1

*Calculado considerando 2 aplicaciones por hectárea

APÉNDICE B SÍNTESIS Y SELECCIÓN DE PROCESOS

Tabla. B.1 Comparación de las técnicas de encapsulación físicas, químicas y fisicoquímicas para inoculantes microbianos

Característica	Secado en spray	Lecho fluidizado	Extrusión	Polimerización interfacial	Gelación iónica	Gelación inversa	emulsiones en aceite
soluble en agua	si	si	si	no	no	no	no
uniforme	no	si	si	muy uniformes	si	si	si
tiempo del proceso	10-30 s	10 min-1 h	10 min-1 h	10 min-2 h	1-2 h	1-2 h	1-2 h
costo relativo	muy bajo	bajo	medio	medio-bajo	medio	medio	medio

Ventajas

- se utiliza a gran escala y permite operar de forma continua
- cápsulas de alta calidad con buen rendimiento y estabilidad
- permite una distribución de tamaño de partícula definida y con baja porosidad
- alta eficiencia térmica
- operación de fácil control
- superficie de lecho pequeña
- altos niveles de deshidratación a temperaturas moderadas (35-40°C)
- estabilidad ante oxidación
- algunas técnicas se pueden desarrollar a gran escala
- biocompatible
- proceso bien desarrollado
- se puede desarrollar a gran escala
- biocompatible
- biocompatible
- biocompatible

Característica	Secado en spray	Lecho fluidizado	Extrusión	Polimerización interfacial	Gelación iónica	Gelación inversa	emulsiones en aceite
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • opera a altas temperaturas (>60°C) • poca uniformidad en las cápsulas producidas • limitación en la elección del material encapsulante (debe ser soluble en agua) 	<ul style="list-style-type: none"> • material a encapsular debe estar en estado sólido y en forma de partículas muy finas 	<ul style="list-style-type: none"> • menor capacidad de difusión y liberación 	<ul style="list-style-type: none"> • limitación en la elección del material encapsulante (la mayoría de los compuestos utilizados son tóxicos para las bacterias) 	<ul style="list-style-type: none"> • limitación en la elección del material encapsulante • complejo control de procesos 	<ul style="list-style-type: none"> • limitación en la elección del material encapsulante • complejo control de procesos 	<ul style="list-style-type: none"> • lenta liberación de las células • complejo control de procesos
Útil para	células termo resistentes y/o capaces de formar esporas	partículas irregulares	enzimas y vitaminas, bacterias termo sensibles	partículas hidrofóbicas	células, enzimas y suspensiones	células, enzimas y suspensiones	células, enzimas y suspensiones

Adaptado de (Schoebitz, López, & Roldán, 2013)

Tabla. B.2 Diferentes dosis utilizadas en experiencias de encapsulación utilizando alginato como agente encapsulante y almidón como relleno y agente estructurante

Producto a encapsular	Materiales para encapsulación	Concentración en mezcla antes de encapsular (g/L)	Razón p/p alginato/aditivo	Razón p/p alginato/biomasa	ufc/g de cápsula	Técnica	Diámetro cápsula húmeda (mm)	Referencia
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Biomasa Alginato Leche descremada CaCl ₂	12 10 -20- 30 20,0 6,0	0,5 - 1 - 1,5	0,83 - 1,67 - 2,5	1,85*10 ⁹ (bs)	N.I.	1 - 2	(Fages, 1990)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Biomasa Alginato Leche descremada CaCl ₂	17,28 20 7,5 11,1	2,667	1,16	2,2*10 ¹¹ (bh)	Equipo de extrusión que utiliza un capilar para la formación de las capsulas de 222 µm de diámetro y una presión de 10-15 psi generada por un compresor de aire	0,1 - 0,2	(Bashan, Hernández, Leyva, & Bacilio, 2002)
Bacterias solubilizadoras de fósforo (<i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Serratia spp.</i>)	Biomasa Alginato Almidón CaCl ₂	1,73 15 400 15	0,038	8,67	7*10 ⁹ (bs)	Sistema de encapsulación que consta de un sistema de alimentación para conducir la matriz de encapsulación, una bomba peristáltica, y un sistema de multisalida con 40 boquillas.	N.I.	(Ceballo, 2012)
Bacterias solubilizadoras de fósforo (<i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Serratia spp.</i>)	Biomasa Alginato Almidón CaCl ₂	N.I. 27,3 427,3 15	0,064	-	2*10 ⁹ (bh)	Extrusión a través de jeringa de 50 mL	4,1	(Schoebitz, Ceballos, & Ciampi, 2013)

Producto a encapsular	Materiales para encapsulación	Concentración en mezcla antes de encapsular (g/L)	Razón p/p alginato/aditivo	Razón p/p alginato/biomasa	ufc/g de cápsula	Técnica	Diámetro cápsula húmeda (mm)	Referencia
<i>Azospirillum brasilense</i> y <i>Raoultella terrigena</i>	Biomasa Alginato Almidón CaCl ₂	5,714 27,3 427,3 11,1	0,064	4,77	10 ⁹ (bs)	Extrusión a través de jeringa de 50 mL	4,6	(Schoebitz, Simonin, & Poncelet, 2012)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Biomasa Alginato Almidón CaCl ₂	2,68 30,0 470,0 15	0,064	11,20	10 ⁹ (bs)	Equipo de extrusión que utiliza una aguja de 1,55 mm de diámetro a una velocidad de 120 ml/h	6	(Ivanova, Teunou, & Poncelet, 2006)
<i>Lactobacillus casei</i>	Biomasa Alginato Almidón CaCl ₂	17,28 20 0 - 100 - 200 - 400 - 600 15	0- 0,2 - 0,1 - 0,05 - 0,03	1,2	N.I.	Extrusión a través de un capilar	2,4 (promedio c/almidón) - 3,3 (s/almidón)	(Chan, et al., 2011)

N.I.: No Indicado

APÉNDICE C BALANCE DE MASA Y ENERGÍA

Tabla. C.1 Correlaciones para el calor específico en [kJ/kg °C] de los componentes de los alimentos como función de la temperatura en [°C] (Choi & Okos, 1986)

Componente	Correlación
Agua	$4,1762 - 9,0864 \times 10^{-5}T + 5,4731 \times 10^{-6}T^2$
Aceite	$1,9331 + 2,5523 \times 10^{-3}T$
Proteína	$2,0082 + 1,2089 \times 10^{-3}T - 1,3129 \times 10^{-6}T^2$
Cenizas	$1,0926 + 1,8896 \times 10^{-3}T - 3,6817 \times 10^{-6}T^2$
Fibra	$1,8459 + 1,8306 \times 10^{-3}T - 4,6509 \times 10^{-6}T^2$
Carbohidratos	$1,5488 + 1,9625 \times 10^{-3}T - 5,9399 \times 10^{-6}T^2$

APÉNDICE D DISEÑO DE EQUIPOS Y EVALUACIÓN ECONOMICA

Tabla. D.1 desglose del costo de edificación

Tipo de espacio	área/ unidad [m ²]	n°	Total [m ²]	[UF/m ²]	Total [UF]
oficinas	9	4	36	20	720
planta principal (estructura metálica)	26	1	26	4	104
bodega	10	1	10	12	120
baños	4,5	2	9	20	180
comedor	9	1	9	12	108
cocina	10	1	10	20	200
laboratorio	10	1	10	20	200
recepción	6	1	6	15	90
sala de reuniones	15	1	15	15	225
servicio (caldera y compresor)	10	1	10	12	120
Sub-total			141		2067
Estructura de galpón			200	8	1600
camarines	10	1	10	12	120
estacionamiento	15	8	120	2	240
Total					4.027

Fuente: (Rodríguez H., 2014)

Tabla. D.2 Clasificación y significado de los distintos tipos de costos

Clasificación	Sub-clasificación	Sub-clasificación	Concepto	Significado
Costo total de inversión (CTI)	Costo fijo de inversión (CF)	Costo fijo directo (CFD)	Equipos instalados	venta, transporte e instalación de los equipos
			Terreno	costo de la propiedad
			Habilitación y mejoramientos de terreno	áreas verdes, estacionamientos y vías de tránsito
			Instrumentación y control	compra, instalación y calibración de softwares y equipos de control
			Cañerías	cañerías, accesorios y válvulas de proceso
			Sistemas eléctricos	instalación de elementos de iluminación, paneles y sistema eléctrico en general
			Edificios y servicios asociados	infraestructura de la planta y oficinas, servicios de ventilación, calefacción y otros
		Instalaciones de servicio	equipos que proveen agua, aire, vapor, combustible, equipamiento de cafetería y otros	
		Costo fijo indirecto (CFI)	Ingeniería y supervisión	costos de ingeniería: administrativos, de proceso, diseño, comunicaciones, transporte y otros
			Servicios de construcción	costo de construcción, operación y mantenimiento de las instalaciones y oficinas
	Costos legales		permisos, estudios de terreno y licencias especiales	
	Empresa constructora		cargo por contratistas	
	Costo de capital de trabajo (CW)			dinero invertido el primer mes de trabajo en: materias primas, provisiones, producto terminado y en proceso de fabricación, cuentas por cobrar y dinero en efectivo para gastos de operación
Costo total de producción (CTP)	Costo de producción o manufactura (CM)	Costo variable de producción (CVP)	Materia prima	materiales requeridos para la fabricación del producto
			Suministros de operación	otros suministros que no son considerados materias primas como lubricantes y compuestos químicos para análisis entre otros
			Mano de obra	remuneraciones mensuales de los trabajadores
			Suministros básicos	costo de agua, electricidad, combustible, refrigeración, disposición de residuos sólidos y líquidos
			Mantenimiento y reparaciones	mantenciones y reparaciones de los equipos e infraestructura
			Costo de laboratorio	costos de análisis de laboratorio para el control de operaciones y calidad del producto
			Catalizadores y solventes	costos de los catalizadores y solventes necesarios
			Patentes y Royalties	costo del pago de patentes y royalties
	Cargos fijos de producción (CFP)	Depreciación	depreciación de los equipos, inmuebles y otros materiales involucrados que presentan una disminución de su valor en el tiempo	
		Impuestos	impuestos a la utilidad y a la ganancia de capital	
		Seguros	seguro para cubrir inmuebles, equipos y otros materiales asegurables	
		Costos generales de la planta	costos generales como envasado, maestranza, cafetería, enfermería y tiendas entre otros	
	Costo general de producción (CGP)	Costos administrativos	salarios de administradores, secretarías, contadores, costos de suministro de oficina y comunicaciones	
		Distribución y marketing	costos asociados a la distribución y marketing del producto	
		Investigación y desarrollo	salarios del personal asociado, costos fijos y de operación de maquinaria y equipamiento, costos de materiales y suministros, entre otros	

Tabla. D.3 Cotización de equipos y referencias

Nomenclatura	Equipo	Costo F.O.B. 2014 [USD]	Cantidad	Referencia
M-1	Mezclador	5.000	2	http://wanyuanqiye.en.alibaba.com/ , (Rodriguez H., 2014)
A-1	Autoclave	2.000	1	http://www.bio-equip.cn/
R-1	Fermentador	15.000	2	(Rodriguez H., 2014)
R-2	Fermentador	20.000	2	(Rodriguez H., 2014)
R-3	Fermentador	30.000	2	(Rodriguez H., 2014)
C-1	Caldera	8.000	1	http://sjsj.en.alibaba.com/ , (Rodriguez H., 2014)
C-2	Compresor	1.000	1	http://www.sodimac.cl/sodimac-cl/ , (Rodriguez H., 2014)
B-1	Bomba peristáltica de tubo	1.200	2	http://www.coleparmer.com/ , (Rodriguez H., 2014)
B-2	Bomba peristáltica de tubo	1.200	2	http://www.coleparmer.com/ , (Rodriguez H., 2014)
B-X₁	Bomba peristáltica de tubo by pass	1.200	1	http://www.coleparmer.com/ , (Rodriguez H., 2014)
S-1	Separador centrífugo	27.071	1	http://liaoyanglongda.en.made-in-china.com/ , (Rodriguez H., 2014)
M-2	Mezclador	3.500	1	http://wanyuanqiye.en.alibaba.com/ , (Rodriguez H., 2014)
J-1	Jetcutter	37.184	1	http://genialab.de/JetCutterS.php
E-1	Estanque de gelificación	15.000	1	(Rodriguez H., 2014)
S-2	Tamiz-filtro de separación	2.500	1	(Rodriguez H., 2014)
E-2	Estanque de recepción y acondicionamiento	5.000	1	http://liaoyanglongda.en.made-in-china.com/ , (Rodriguez H., 2014)
D-1	Secador	18.000	1	(Rodriguez H., 2014)
IC-1	Calentador de aire	1.500	1	(Rodriguez H., 2014)
V-1	Ventilador	3.253	1	http://tzdeyi.en.made-in-china.com/

B-3	Bomba peristáltica de tubo	1.200	2	http://www.coleparmer.com/ , (Rodríguez H., 2014)
B-4	Bomba peristáltica de manguera	2.000	1	http://www.verderflex.com/
B-5	Bomba centrífuga	500	1	http://www.pedrollo.com/cms/
B-6	Bomba centrífuga	500	1	http://www.pedrollo.com/cms/
B-X₄	Bomba peristáltica de manguera by pass	2.000	1	http://www.verderflex.com/
B-X₅	Bomba centrífuga by pass	500	1	http://www.pedrollo.com/cms/
-	equipo a vacío para empaque	600		http://cnhz.en.alibaba.com/
-	balanzas	367		http://wantbalance.en.alibaba.com/
-	shakers	800		http://selontech.en.alibaba.com/
-	refrigerador	1.300		http://tedopower.en.alibaba.com/
-	horno	600		http://snt-testing- equipment.en.alibaba.com/
-	instrumentación de laboratorio	100		estimado
-	empaques	360		http://hongdatai.en.alibaba.com/
-	otros	825,4		estimado

Tabla. D.4 Consumo energético por lote

Equipo	cantidad	P [kW]	tiempo [h]	consumo [kWh]
M-1	2	0,002	0,333	0,00074
A-1	1	3	2	6
R-1	2	0,0001	10,523	0,00105
R-2	2	0,006	15,382	0,09978
R-3	2	0,536	13,700	7,34839
S-1	1	1,100	0,429	0,471
M-2	1	1,000	0,500	0,500
J-1	1	0,120	0,443	0,053
E-1	1	0,000	0,500	0,000
S-2	1	1,500	0,667	1,000

Equipo	cantidad	P [kW]	tiempo [h]	consumo [kWh]
E-2	1	0,004	0,167	0,001
D-1	1	1,500	2,483	3,724
V-1	1	0,600	2,483	1,490
B-1	2	0,249	0,429	0,107
B-2	2	0,249	0,107	0,027
B-3	2	0,249	0,105	0,026
B-4	1	0,300	0,443	0,133
B-5	1	0,370	0,500	0,185
B-6	1	0,370	0,424	0,157
B-X₁	1	0,249	0,429	0,107
B-X₄	1	0,300	0,443	0,133
B-X₅	1	0,370	0,500	0,185
Total	29	18,973	52,988	29,356

Tabla. D.5 Consumo energético de la caldera por lote

Operación	cantidad	Vapor [kg]	P [kW]	tiempo [h]	consumo [kWh]
Esterilización R-2	2	9,054	11,077	0,500	5,539
Esterilización R-3	2	90,539	55,385	1,000	55,385
Secado (IC-1)	1	135,511	33,158	2,500	82,895
Total					204,742

Tabla. D.6 Consumo energético compresor por lote

Operación	cantidad	tiempo [h]	P [kW]	consumo [kWh]
Fermentación R-1	2	10,5	2,2	46,30
Fermentación R-2	2	15,4	2,2	67,68
Fermentación R-3	2	13,7	2,2	60,28
Total				174,27

Tabla. D.7 Consumo de agua por lote

Operación	[m³/lote]
Medio de cultivo	0,21
Esterilización	1,55
Lavado de cápsulas	0,21
Solución CaCl₂	0,21
Vapor IC-1	0,14
Lavado	1,18
Total	3,50

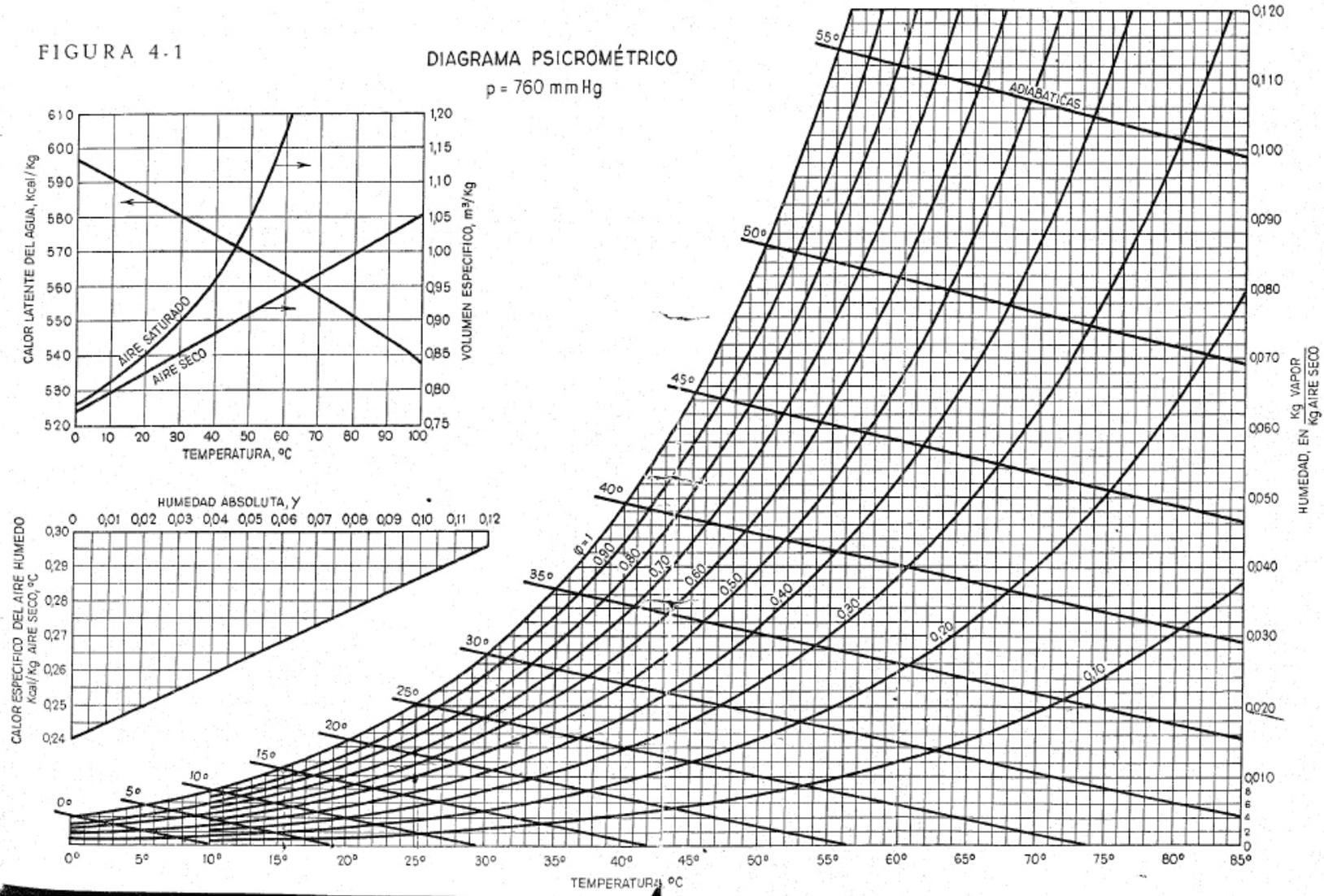


Figura D.1 Carta Psicrométrica

APÉNDICE E PATENTES

A continuación se presenta la patente con fecha de solicitud 16 de diciembre de 1996 N° 2093559 y fecha de publicación el 01 de julio de 1997.

En ella se presenta el procedimiento de obtención de un fertilizante a base de *Azotobacter vinelandii* y *Azospirillum brasilense*.