

**“DISEÑO DE UN PRODUCTO BIOTECNOLÓGICO A BASE DE  
MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS COMO HERRAMIENTA EN  
PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS Y SUELOS CONTAMINADOS  
POR LA CIANURACIÓN EN EL BENEFICIO DEL ORO.”**

**SANDRA LILIANA PABÓN**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE BOLÍVAR  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN  
CARTAGENA  
2017**

**“DISEÑO DE UN PRODUCTO BIOTECNOLÓGICO A BASE DE  
MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS COMO HERRAMIENTA EN  
PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS Y SUELOS CONTAMINADOS  
POR LA CIANURACIÓN EN EL BENEFICIO DEL ORO.”**

**SANDRA LILIANA PABON**

**Informe final para optar al título de Magíster en Ingeniería de Producción.**

**Director  
PhD JAIME ACEVEDO CHEDID**

**Codirectora  
PhD JORGELINA PASQUALINO**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE BOLIVAR  
FACULTAD DE INGENIERIA  
MAESTRIA EN INGENIERIA DE PRODUCCION  
CARTAGENA  
2017**

## DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios y a mi Familia.

A Dios porque siempre ha estado a mi lado en cada proyecto que emprendo, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mi Familia, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mí apoyo en todo momento.

Depositando su entera confianza en cada reto que se me presenta sin dudar ni un solo momento de mi potencial.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de muchas personas.

Por esto agradezco al Centro Agroempresarial y Minero SENA- Bolívar, PhD Jaime Acevedo y PhD Jorgelina Pasqualino, mis compañeros Gillean, Katherine, Jorge y Kelly, quienes durante este proceso me acompañaron con sus capacidades y conocimientos en el desarrollo de este trabajo de investigación y llenando todas las expectativas.

A mi Familia que a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica.

A mí adorado, que siempre me motivo a no rendirme en cada fase del proyecto, por creer en mis capacidades y darme ánimo ante este gran reto que decidí enfrentar.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	14
INTRODUCCION.....	16
1. GENERALIDADES DEL PROYECTO.....	18
1.1 PRODUCTO BIOTECNOLOGICO.....	18
1.2 PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	19
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION.....	21
1.3.1 General.....	21
1.3.2 Específicos.....	21
1.4 METODOLOGIA.....	22
1.4.1 Definición las especificaciones generales del producto.....	22
1.4.2 Selección y evolución de ideas.....	23
1.4.3 Diseño preliminar.....	23
1.4.4 Prototipado del producto.....	24
1.4.5 Diseño de producto final.....	25
1.4.6 Elaboración y entrega del documento final.....	25
2. ESTRUCTURAS DE I+D+i EN BIOTECNOLOGIA.....	26
2.1 I+D+i EN BIOTECNOLOGIA.....	26
2.2 CARACTERIZACION DE LAS EMPRESAS BIOTECNOLOGICAS.....	28
2.3 MODELOS DE I+D+i EN BIOTECNOLOGIA EN EL MUNDO.....	31
2.3.1 Estados Unidos.....	31
2.3.2 Taiwan.....	37
2.3.3 España.....	38
2.3.4 Chile.....	41
2.3.5 Colombia.....	43
3. METODOLOGIA DE DISEÑO DE PRODUCTO.....	50
3.1 GENERALIDADES DE DISEÑO DE PRODUCTO.....	50

3.2 INGENIERIA CONCURRENTE (IC) .....	51
3.3 DESPLIEGUE DE LA FUNCION DE LA CALIDAD(QFD) .....	53
3.4 CALIDAD DESDE EL DISEÑO(QbD) .....	56
3.5 BIOMECATRONICA .....	59
4. DISEÑO MEDIANTE LA METODOLOGIA BIOMECATRONICA DE UN PRODUCTO BIOTECNOLOGICO A BASES DE MICROORGANISMOS AUTOCTONOS .....	63
4.1 DEFINICIÓN DE ESPECIFICACIONES OBJETIVOS PARA LA FERMENTACIÓN Y BIOSEPARACIÓN DEL PRODUCTO .....	65
4.2 ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE LAS PROPUESTAS DE LA CONFIGURACIÓN DEL BIORREACTOR Y LA UNIDAD DE BIOSEPARACIÓN. .....	68
4.3 SIMULACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN SELECCIONADA .....	73
4.4 RESULTADOS DE LA SIMULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> .....	81
5. PROTOTIPADO Y DISEÑO FINAL.....	92
5.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	92
5.1.1 Fermentación .....	92
5.1.2 Resultados seguimiento y control de las fermentaciones .....	97
5.2 BIOSEPARACIÓN SÓLIDO –LÍQUIDO .....	99
5.2.1 Resultados bioseparación solido líquido.....	101
5.3 PROTOTIPADO .....	102
5.4 CONTROL DE CALIDAD DEL PROTOTIPOS.....	106
5.5 ESPECIFICACIONES TECNICAS DEL PROCESO .....	108
5.6 ESPECIFICACIONES TECNICAS DEL PRODUCTO.....	110
CONCLUSIONES.....	112
BIBLIOGRAFÍA.....	114
ANEXOS .....	122

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Factores a considerar al decidir sobre el concepto de diseño. ....	23
Figura 2. Proceso de Prototipado del producto biotecnológico .....	25
Figura 3. Redes Claves de un Sistema de Innovación en Biotecnología.....	27
Figura 4. Modelo de Investigación, Desarrollo e Innovación Radical en Estados Unidos. ....	32
Figura 5. Modelo Creación plataforma tecnológica. Fuerte inversión en I+D con resultados en el medio plazo (3-5 años). Estados Unidos .....	33
Figura 6. Inversiones trimestrales en la Industria Biotecnológica 2014- Estados Unidos .....	35
Figura 7. Condiciones de acceso al mercado biotecnológico de EEUU .....	36
Figura 8. Modelo del Sistema I+D+i de Biotecnología en Taiwán .....	37
Figura 9. Factores claves en I+D+i de Biotecnología en España. ....	39
Figura 10. Evolución de la Inversión de capital riesgo en biotecnología en España en el periodo 2001-2011 .....	41
Figura 11. Mapa de relación de los principales actores de I+D+i en Chile .....	42
Figura 12. Estrategia Nacional de Innovación en Colombia .....	43
Figura 13. Inversión en I+D+i en Biotecnología 2011-2013.....	49
Figura 14. Metodología de calidad basada en el diseño QbD para el desarrollo de productos.....	59
Figura 15. Metodología aplicado en Diseño Biomecatronico .....	62

Figura 16. Producción de Inoculante microbiano ( Bacillus spp) mediante operación batch o por lotes. ....	65
Figura 17. Diagrama de flujo de producción de inoculante -100 L.....	77
Figura 18. Análisis Ingresos - Costo de Producción- Precio de venta. ....	86
Figura 19. Condiciones de las corridas experimentales de Bioseparación sólido- líquido. ....	101
Figura 20. Tiempo de centrifugación (rpm) vs Peso seco (g/L). ....	102
Figura 21. Evaluación de dosis de aplicación .....	108



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características del Mercado Biotecnológico en Estados Unidos .....	34
Tabla 2. Empresas de Base Biotecnológica en Colombia. ....	44
Tabla 3. Condiciones de operación para la producción del inoculante – 100L .....	66
Tabla 4. Parámetros objetivos para la bioseparación sólido-líquido (BSL) .....	67
Tabla 5. Puntaje correlaciones .....	70
Tabla 6. Evaluación de los parámetros objetivos para las alternativas de la producción de biomasa. ....	71
Tabla 7. Evaluación de los parámetros objetivos para las alternativas de bioseparación de las células bacterianas. ....	73
Tabla 8. Composición del medio de producción adaptado de Giacaman (2006). ....	76
Tabla 9. Condiciones de operación para la producción del inoculante – 100L .....	78
Tabla 10. Balance estequiométrico de la fermentación en un reactor de 100 litros. ....	80
Tabla 11. Datos globales de proceso de producción. ....	81
Tabla 12. Cantidad de materia prima y producto arrojado en la simulación del proceso de producción de <i>Bacillus subtilis</i> (kg/año). ....	83
Tabla 13. Costos materia prima. ....	84
Tabla 14. Resumen Evaluación Económica de los procesos de producción simulados .....	88
Tabla 15. Resumen de la estimación costos fijos .....	89

Tabla 16. Costos de operacional anual.....	90
Tabla 17. Generación de residuos según su tipo .....	91
Tabla 18. Resultados de las corridas experimentales de las fermentaciones a escala de 4L para 200 rpm. ....	98
Tabla 19. Resultados de las corridas experimentales de las fermentaciones a escala de 4L para 175 rpm. ....	98
Tabla 20. Resultados de las corridas experimentales de las fermentaciones a escala de 4L para 150 rpm .....	99
Tabla 21. Control de calidad prototipo .....	106
Tabla 22. Condiciones de evaluación de dosis de aplicación.....	107

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Variables de Análisis para la identificación de ideas de producto biotecnológicos .....	22
Cuadro 2. Clasificación de las empresas de biotecnología según la Asociación Española de Bioempresas( ASEBIO).....	28
Cuadro 3. Clasificación de las empresas de biotecnología según actividad productiva .....	29
Cuadro 4. Diferencias entre la Industria de la Tecnología de la Información y la Biotecnología.....	30
Cuadro 5. Plataforma de Mercados Biotecnológicos en España.....	40
Cuadro 6. Comparativo de los modelos de I+D+i.....	46
Cuadro 7. Factores del diseño concurrente para el diseño de productos.....	53
Cuadro 8. Factores de QFD para el diseño de productos .....	54
Cuadro 9. Características de los Bioreactores a evaluar .....	68
Cuadro 10. Características de los procesos de Bioseparación sólido-líquido a evaluar.....	69
Cuadro 11. Configuración General de Simulación .....	75
Cuadro 12. Características del fermentador .....	93
Cuadro 13. Actividades del desarrollo experimental de las fermentaciones .....	94
Cuadro 14. Actividades del desarrollo experimental de las fermentaciones.....	100

Cuadro 15.Actividades del desarrollo experimental de las fermentaciones. ....	102
Cuadro 16.Elaboración de Prototipos. ....	104
Cuadro 17.Descripción final prototipos. ....	105
Cuadro 18.Especificaciones técnicas del proceso de producción del inoculante.	109
Cuadro 19.Especificaciones técnicas del producto .....	110

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 INFORME DE MATERIALES Y CORRIENTES .....	122
Anexo 2 EVALUACION ECONOMICA DE LAS CORRIDAS.....	124
Anexo 3 INFORME DEL IMPACTO AMBIENTAL .....	126
Anexo 4 DETERMINACION DE BIOMASA POR PESO SECO .....	128
Anexo 5 DETERMINACION DE BIOMASA POR RECUENTO EN PLACA.....	129
Anexo 6 DETERMINACION DE CIANURO POR COLORIMETRIA .....	130

## RESUMEN

Los productos biotecnológicos en el transcurso del tiempo han sufrido unas series de desarrollos de acuerdo a las necesidades de los diferentes sectores logrando posesionarse en el elemento crucial en la aplicación de procesos de manufactura hasta la remediación de los recursos aguas/suelos contaminadas por los procesos extractivos y en especial en el beneficio de oro que emplea la lixiviación con cianuro, el cual tiene efectos negativos fauna, flora y en los humanos.

El objetivo del presente trabajo fue diseñar un producto biotecnológico a base de microorganismos autóctonos con potencial degradador de cianuro a través de la metodología denominada Biomecatrónica, realizando un análisis desde la obtención del inóculo hasta la separación del mismo.

Se analizaron en varias escalas (10L, 100L, 1,000L y 10,000L). Las simulaciones de los casos objetivos se realizaron en *SuperPro Designer* versión 9, un software empleado en el modelado, evaluación y optimización de procesos de la industria biotecnológica.

Se evidenció que para los dos primeros casos de estudio (10L y 100L) no son económicamente rentables; para ellos se analizaron variables como costo de operación, tiempo de recuperación de capital.

Para las escalas de mayor volumen de producción se reduce el costo de operación. Determinándose que el costo de venta mínimo del inoculante para el proceso de 10,000L es de US\$ 4.85 /kg (dólares americanos) . De acuerdo al análisis de costo de producción y ventas, podemos decir que, a partir de un volumen de producción de 10,000L, el proceso se vuelve económicamente factible.

En el análisis de la evaluación ambiental se resalta que la mayor producción de residuos líquidos (9 L/ kg de biomasa), cero (0) producción de residuo sólidos y 0,000 4 kgCO<sub>2</sub>/Kg de biomasa, determinándose que es viable y que los impactos que se puedan presentar son controlables.

En la fase de desarrollo experimental de las fermentaciones, separación celular y prototipado a escala laboratorio se determinó que la velocidad de agitación óptima es 200 rpm con una producción de peso seco de 9.878 g de biomasa/L y la velocidad de centrifugación de mayor rendimiento fue 3500 rpm por 2 minutos. La formulación del prototipo entre las cuatro evaluadas la más estable fue la que se elaboró a base de caolín manteniendo una conservación del 97.61% y a su vez se estableció que la dosis de aplicación es de 1g/100 ml con un porcentaje de remoción del 95.4%.

**PALABRAS CLAVES:** PRODUCTO BIOTECNOLOGICO, BIOMECATRONICA, INOCULANTE, *Bacillus spp*, INOCULANTE

## INTRODUCCION

En Colombia, el sector minero ha presentado un desarrollo significativo en especial la explotación y beneficio del oro debido a su incremento de su precio en los mercados internacionales, generando un gran interés en el sector aurífero pues desde el entre 2008 y 2012 la producción aurífera se situó en promedio en 51.6 toneladas al año, mientras entre 1990 y 2007 el promedió fue 27.3 toneladas para 2012 reporto un record de más 66 toneladas/año ( FEDESARROLLO-IDB, 2014).

Los cuatro departamentos con mayor producción aurífera son: Antioquia, Bolívar, Chocó y Caldas, donde están el 77% (3181) de las unidades de producción minera de oro (Ministerio de Minas y Energia, 2012) y cerca del 87% de la producción de oro del país en 2012 según el SIMCO, identificándose que sólo el 25% procesa o almacena relaves y el 37% los arroja sin ningún tipo de tratamiento ya sea al río, al campo o simplemente los entierran.

Con respecto a la uso de productos químicos para el beneficio del oro, Chocó sobresale por bajos niveles bajos de aplicación de químicos con respecto a los otros tres departamentos. Bolívar tiene la mayor intensidad de uso de mercurio con el (87%) y cianuro (47%); en Antioquia el 59% de las unidades emplea mercurio en su producción y, en Caldas, donde la producción es mayoritariamente de veta, se presenta una elevada utilización de explosivos (79%) y en contraste, se observa una baja utilización de cianuro (13%) y ausencia de uso de mercurio. (FEDESARROLLO-IDB, 2014).

La aplicación del cianuro genera un alto consumo y por su naturaleza tóxica y potencialmente letal termina llegando a las corrientes de aguas y suelos generando una serie de impactos negativos en la fauna, flora y en los humanos.



El tratamiento de este contaminante se ha abordado desde diferentes tecnologías (químicas y físicas) pero es de gran interés abordarlo desde la biorremediación a través de la bioaumentación, técnica centrada en la utilización de microorganismos autóctonos tolerantes y degradadores del cianuro.

Para este estudio se empleó un microorganismo con potencial de tolerar y degradar el cianuro y se plantea diseñar un producto biotecnológico a base *Bacillus spp* (aislado de aguas y suelos contaminados con cianuro) aplicando la metodología Biomecatrónica que facilita y organiza el trabajo de desarrollo de productos mediante el uso de procedimientos simples, herramientas, modelos para determinar la viabilidad técnica, económica y ambiental, finalmente llegando al prototipado del producto evaluación su calidad en función presentación, efectividad y estabilidad en el tiempo.

Este trabajo de investigación se va a transferir a los pequeños y medianos mineros artesanales del Sur de Bolívar con el objeto de mitigar los efectos negativos del cianuro y contribuir a un beneficio sostenible del oro.

## **1. GENERALIDADES DEL PROYECTO**

### **1.1 PRODUCTO BIOTECNOLOGICO**

A medida que han evolucionado los productos biotecnológicos se han estructurado diferentes conceptos de lo que es un producto de esta naturaleza, Trevan et al. (1990) Basándose en los sectores idóneos para desarrollar la biotecnología resalta que es la " aplicación de organismos, sistemas y procesos biológicos en las industrias manufactureras y de servicio".

En México la Reforma de la Ley General de Salud resaltando(1997) determina, en el capítulo XII, artículo 282 bis, que los productos biotecnológicos " son aquellos alimentos, ingredientes, aditivos, materias primas, insumos para la salud, plaguicidas, sustancias tóxicas o peligrosas, y sus desechos, en cuyo proceso intervengan organismos vivos o parte de ellos modificados por técnicas tradicionales o ingeniería genética".

García & Machinea (2005), establecen que los productos biotecnológicos son aquellos que son productos de las aplicaciones de la biotecnología moderna incluyendo el desarrollo de nuevos fármacos y proteínas recombinantes, la producción de vacunas, insumos biológicos agrícolas como biofertilizantes y biopesticidas; nutracéuticos y cosméticos; producción de cultivos transgénicos, de enzimas industriales y la producción de biocombustibles.

Malacarne (2006) los conceptualiza como el resultado de la aplicación de técnicas o procesos propios de la biotecnología, y su vez organiza las tecnologías, que por el uso de organismos vivos o parte de ellos, permiten la obtención de bienes y servicios.

Se puede considerar que los elementos comunes de los anteriores conceptos es que cada uno gira alrededor de los organismos vivos ( plantas, animales, células microbianas) y a estos se les aplican una serie de técnicas para obtener un bien o servicio. Lo fundamental de lo planteado es que se requiere de estudios metódicos y sistemáticos de cada uno de ellos para que tenga el impacto positivo en las diferentes áreas destinos de los productos.

El concepto desarrollado por García & Machinea (2005) considera que los productos biotecnológicos son tan solo aquellos obtenidos a partir de la ingeniería genética. Sin embargo, de acuerdo con, la opinión de estos autores se considera que el concepto es sesgado pues hay productos biotecnológicos milenarios que han hecho aportes significativos en la evolución y desarrollo de la biotecnología empírica hasta la moderna.

## **1.2 PROBLEMA DE INVESTIGACION**

La extracción minera se ha extendido a casi todo el territorio nacional y se caracteriza por ser una minería muy heterogénea tanto en el uso de técnicas de extracción como por la gran diversidad de materiales que se obtienen.

En términos generales, los minerales que se explotan en Colombia se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: carbón mineral, minerales concentrados, minerales metálicos y minerales no metálicos (Quijano Samper & Pardo, 2010). La minería es una de las actividades extractivas primaria que mayor impacto generan sobre el medio ambiente, sea está a cielo abierto o subterránea, en áreas rurales o urbanas.

En el subsector de la minería de oro en un solo día de explotación una mina mediana procesa 25 mil toneladas de rocas, produce 25 kilos de oro, 50 mil toneladas de desechos, consume 35.500.000 millones de litros de agua y 4 toneladas de cianuro que son desechados en los recurso agua y suelo.

La lixiviación por cianuro en el beneficio del oro es una técnica de bajo costo que permiten procesar rocas que contienen oro en muy bajas concentraciones. Lo que queda en la naturaleza se calcula en 100 mil toneladas y para extraerlo al ritmo actual, las multinacionales tardarían 40 años y emplearían alrededor de 15 millones de toneladas de cianuro.

La cianuración de la roca mineralizada con oro causa la liberación de metales pesados en cantidades mucho mayores que las del propio oro. Por cada gramo de oro se pueden generar 40 gramos de arsénico, 10 gramos de cromo, 170 gramos de plomo y 50 gramos de zinc (Garay, y otros, 2013).

Para la Contraloría General de la República, considera que la extracción de minerales e hidrocarburos puede causar una serie de impactos negativos como la contaminación de aguas y suelos, arriesgándose la diversidad, la soberanía alimentaria, pues las especies químicas tóxicas liberadas pueden permanecer por un largo plazo (Londoño, 2013).

Corantioquia, relacionó que “entre el bajo Cauca y el nordeste antioqueño se estima alrededor de 35.000 hectáreas degradadas por minería, con diferentes grados de degradación, algunas en un estado crítico, en donde difícilmente puede volverse a configurar un suelo” (Peña, 2013).

Los derrames de cianuro impactan la fotosíntesis y las capacidades reproductivas de las plantas. En cuanto a los animales, el cianuro puede ser absorbido a través de la piel, ingerido o aspirado. Concentraciones en el aire de 200 partes por millón (ppm) de cianuro de hidrógeno son letales para los animales, mientras que concentraciones tan bajas como 0,1 miligramos por litro (mg/l) son letales para especies acuáticas sensibles (Sacher, 2011). Las dosis letales para humanos son, de 1 a 3 mg/kg del peso corporal, en caso de que sean ingeridas, de 100-300 mg/kg en caso de ser asimilados y de 100-300 ppm si son aspirados (García H. , 2011)

Para los procesos de recuperación medioambientales de los recursos afectados por la cianuración en el beneficio del oro hacen necesario la utilización de procesos de biorremediación, por lo tanto; es importante diseñar un producto eficaz a base de microorganismos autóctonos con potencial degradador de cianuro y así proporcionar una alta eficiencia de remoción de dicho contaminante a bajo costo y que no produzca residuos tóxicos como resultado de la biodegradación.

### **1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION**

#### **1.3.1 General**

Diseñar un producto biotecnológico a base de microorganismos autóctonos como herramienta en procesos de biorremediación de aguas y suelos contaminados por la cianuración en el beneficio del oro.

#### **1.3.2 Específicos**

- ✓ Definir las especificaciones generales del producto biotecnológico a través de generación y evaluación de ideas que contribuyan a su aceptación en el mercado.
- ✓ Valorar la factibilidad técnica y económica del producto biotecnológico.
- ✓ Formular el diseño preliminar del producto biotecnológico contemplando consideraciones cercanas al proceso de producción.
- ✓ Generar un prototipo del producto y ensayar su funcionamiento para determinar las características más importantes que deberá presentar en su estado final.

## 1.4 METODOLOGIA

Para el cumplimiento de los objetivos planteados en este proyecto, se llevó a cabo una investigación proyectiva.

### 1.4.1 Definición las especificaciones generales del producto

Se realizó la identificación de ideas para el diseño del producto a través del análisis de la demanda y el empuje tecnológico y sus componentes como se relacionan en el cuadro 1.

**Cuadro 1** Variables de Análisis para la identificación de ideas de producto biotecnológicos

<b>TIRON DE LA DEMANDA</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Clientes</li><li>• Mercado</li><li>• I+D</li><li>• Proveedores</li><li>• Competidores</li></ul>
<b>EMPUJE TECNOLOGICO</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Resultados de los procesos de investigación.</li></ul>

**Fuente:** Villamil & García ,( 2003)

Del análisis se pudo clasificar el diseño del producto en función de la novedad del producto y del mercado de destino, en:

- ✓ Mejoras de productos existentes dirigidas al mercado habitual.
- ✓ Productos nuevos en el mercado habitual.
- ✓ Productos en mercados nuevos.

### 1.4.2 Selección y evolución de ideas.

Las ideas fueron generadas a partir de la revisión de literatura especializada, opiniones de experto, datos experimentales centrándose en la fermentación – separación del producto biotecnológico y luego fueron sometidas una serie de valoraciones antes de recibir la aprobación necesaria para luego iniciar su diseño y prototipado.

La identificación de estos es por lo tanto de interés para la evaluación posterior de las alternativas de diseño. Esto pudo aumentar la resolución iterativa de las especificaciones de los objetivos y proporcionar especificaciones más cercanas o claves para la continuación de los trabajos de diseño.

### 1.4.3 Diseño preliminar

En esta fase se especificó los factores de funcionamiento y características que tuvo el producto final. Se definió cómo debería funcionar el producto cuando el cliente lo emplee, es decir, cuál es su tiempo de aplicación, cuáles serán sus funciones, cómo debe ser de rápido en su función, cuáles son los materiales a emplear, etc. Mediante la experimentación se probó el prototipo y de ahí surgió el concepto de diseño o diseño preliminar. En la figura 1, se encuentran los factores a considerados al decidir sobre el concepto de diseño:

**Figura 1** Factores a considerar al decidir sobre el concepto de diseño.



**Fuente:** Autor, 2016

- *Función:* se deben identificar claramente las funciones que el nuevo producto debe desarrollar, estableciendo jerarquías entre ellas si fuera necesario.
- *Costos:* no deben ser excesivos para el mercado objetivo.
- *Calidad:* debe ser compatible con el propósito. Un nivel excesivo puede encarecer el producto en demasía y una calidad insuficiente dará lugar a reclamaciones o incluso a la falta de aceptación del producto en el mercado.
- *Impacto ambiental:* de acuerdo con este aspecto, el artículo no debería dañar el ambiente o estar envasado en recipientes peligrosos.
- *Producción:* cuando se diseña un producto, se debe considerar cómo se va a fabricar simultáneamente.
- *Accesibilidad:* considerando este aspecto lo que se pretende es conocer cómo el cliente va a conseguir el producto o servicio desarrollado.

#### **1.4.4 Prototipado del producto**

Esta es una de las fases más importantes del proceso de investigación; puesto que el prototipo pretende reflejar las características que el producto deberá presentar en su estado final, por lo que se elaboró a partir del concepto de diseño generado en la fase anterior. Sin embargo, algunas cualidades importantes no pueden ser recogidas por el prototipo, por lo que éste se considera más un elemento para la recogida de información adicional que para la toma de decisiones. En la figura 2, se presentan las diferentes actividades que se van a desarrollar en el proceso de prototipado.



**Figura 2.**Proceso de Prototipado del producto biotecnológico



**Fuente:** Propia del autor.

#### **1.4.5 Diseño del producto final.**

En esta etapa se especificó las características del producto definitivo, como resultado de las pruebas que se realizaron con el prototipo y tomando como base el diseño preliminar.

#### **1.4.6 Elaboración y entrega del documento final.**

Se documentaron los resultados más relevantes del proceso de investigación .

## **2. ESTRUCTURAS DE I+D+i EN BIOTECNOLOGIA**

Es de resaltar que la biotecnología a diferencia de otras tecnologías, como la industria petroquímica y la siderúrgica, está presente en el campo productivo, comercial y empresarial, comportándose como una red de elementos, cada uno de los cuales aporta valor al producto, proceso o servicio. La innovación, el desarrollo y la investigación son elementos que han ganado un gran espacio e importancia, generando la necesidad de la creación de grupos de investigación e innovación en las empresas de base biotecnológica y biotecnológicas.

### **2.1 I+D+i EN BIOTECNOLOGIA**

El pilar del avance en biotecnología es la innovación. De acuerdo a la inversión en I+D+i que realicen los diferentes sectores de un país (público, privado) concretará el progreso de la biotecnología desde el ámbito académico hasta el desarrollo económico y comercial.

A nivel mundial se encuentran cientos de universidades, centros e institutos que han consolidado grupos académicos de alto nivel, programas de pregrado-postgrado guiadas por dos fuertes tendencias como lo es la investigación y el desarrollo en biotecnología o áreas afines que terminan materializando productos o servicios biotecnológicos.

El sector privado promueve el I+D+i contribuyendo a la maquinaria económica de la biotecnología en el mundo.

En la Figura 3, se representan las cuatros redes que constituyen un sistema de innovación biotecnológico, las cuales son:

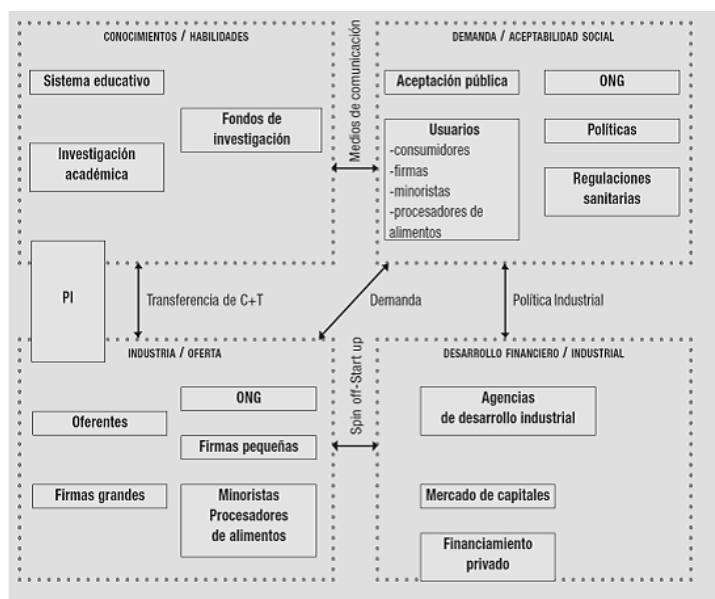
Red de conocimientos y habilidades. Se presenta inversión pública en el sector de investigación así como también la destinada a la formación de talento humano para desarrollar procesos de innovación. En este espacio se plantean estrategias para promover la transferencia de ciencia, tecnología y propiedad intelectual, facilitando la apropiación de los resultados de la investigación.

Red de industrias y oferta; conformada por las empresas productoras de bienes y servicios biotecnológicos y las organizaciones no gubernamentales.

Red de desarrollo financiero e industria; se encuentran los instrumentos de promoción para la creación de empresas ya que se busca crear vínculos entre la investigación académica e industrial que facilitan la adquisición de tecnología para la pequeña, mediana y gran empresa.

Red de demanda y aceptabilidad social; se resalta el vínculo que existe entre conocimiento, innovación, tecnología y sociedad (University of Sussex, Science Policy Research Unit, 2001).

**Figura 3.** Redes Claves de un Sistema de Innovación en Biotecnología



**Fuente:** Ministerio de Industria y Energía Uruguay, 2011

## 2.2 CARACTERIZACION DE LAS EMPRESAS BIOTECNOLOGICAS

Las empresas de biotecnología generan diversos niveles de impacto en la cadena productiva: innovación, conocimiento y herramientas técnicas; diseño de procesos; capacidad de manufactura; validación y prueba; comercialización y detección de oportunidades de mercado. En el cuadro 2, se presenta la clasificación de la empresas de biotecnología (ASEBIO,2006) :

**Cuadro 2.** Clasificación de las empresas de biotecnología según la Asociación Española de Bioempresas- ASEBIO

<b><i>Empresas dedicadas Completamente a la Biotecnología</i></b>	<b><i>Empresas dedicadas Parcialmente a la Biotecnología</i></b>	<b><i>Empresas Usuarias de Biotecnología</i></b>
Más del 80% de su actividad es biotecnológica. Más del 50% de su facturación total es atribuida a la biotecnología. Presentan una alta inversión en investigación y desarrollo	Alguna de sus líneas principales de negocio es biotecnología, sin llegar a presentar un 80% de la actividad total de la empresa. Una parte de su facturación es debido a la biotecnología.	Consultoras, asesoras. Desarrollo en Bioinformática. Empresas comercializadoras de productos biotecnológicos. Otros servicios auxiliares

**Fuente:** Gonzalez & Otros (2007).

En el cuadro 3, se presenta como el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (2010), bajo los estudios realizados por Ratledge & Kristiansen (2001); Lemarié et al (2001) y Shie et al (2002), considera que la actividad productiva que las empresas de biotecnología desarrollan en el mundo se podría dar de la siguiente forma:

**Cuadro 3.**Clasificación de las empresas de biotecnología según actividad productiva

<b>Empresas de Innovación Biotecnología</b>	Son empresas que desarrollan patentes, que publican y que generan conocimiento; no necesariamente están asociadas a una Institución Educativa. Normalmente este tipo de firmas, esperan el desarrollo intensivo, activo de tecnología, desarrollan Tecnología y la transfieren.
<b>Empresas de Innovación Ingeniería</b>	Son empresas capaces de adaptar tecnología a unidades de manufactura, escalar procesos, desarrollar ingeniería de productos finales, ingeniería básica y de detalle e ingeniería de aplicaciones de procesos y de productos.
<b>Empresas de Manufactura de Productos Biotecnológicos</b>	Son empresas que desarrollan o adaptan procesos de producción en gran escala y para productos derivados de innovación. Suelen ser empresas grandes que se enfocan en la producción de compuestos de alto volumen, que funcionan como ingredientes o insumos de grandes cadenas de producción.
<b>Empresas de Servicios Técnicos y Analíticos</b>	En biotecnología es necesario, para empresas de innovación o de soluciones de ingeniería, validar en pequeña escala los nuevos procesos. Son necesarios por tanto, los campos experimentales, los invernaderos y viveros; así como el análisis de cientos o miles de muestras que requieren de equipo analítico en el nivel del estado del arte.
<b>Empresas Consumidoras de Productos e Ingredientes de origen biotecnológico.</b>	Aquellas empresas que en gran escala incorporan a sus productos finales ingredientes biológicos o productos derivados de biosíntesis, constituyen el principal motor de mercado de toda la cadena de producción de la cadena biotecnológica.

**Fuente:** Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada IPN, (2010).

En el Cuadro 4, se establecen las diferencias de las tecnologías de la información versus Biotecnología, resaltándose que en biotecnología se requiere de procesos de investigación extenso; requiere una estricta protección industrial e intelectual; permanente regulación jurídica y ética de los productos y procesos; convenios de cooperación entre grupos de investigación. De esta forma, las empresas de biotecnología suelen generar más valor en relación a su tamaño como resultado de una mayor vigencia en el mercado de los productos desarrollados. Los ciclos comerciales, las necesidades de gestión de fondos para innovación y los costos del desarrollo son también diferencias importantes de la biotecnología con respecto a otras tecnologías productivas (Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada IPN, 2010).

**Cuadro 4.** Diferencias entre la Industria de la Tecnología de la Información y la Biotecnología

<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>TECNOLOGIA DE LA INFORMACION</b>	<b>BIOTECNOLOGIA</b>
Ciclo de vida de producto Requerimientos tecnológicos y profesionales	Muy corto, un año.	Largo plazo, hasta 30 años.
Requerimientos financieros y materiales	Limitado a costos laborales, hardware y Software.	Una industria con aplicación intensiva de capital.
Gestión de fondos	Las empresas nuevas la mayor parte lanzan productos sin soporte financiero.	La gestión de capital es esencial. Ocupa recursos y tiempo de los empresarios.
Ciclos de I & D	Muy corto, colaboración virtual de equipos.	Para desarrollo de producto 1 a 2 años. Para desarrollos ligados a descubrimiento 20 a 30 años.
Requerimientos regulatorios y legales	El mercado rebasa las regulaciones jurídicas.	Profunda y estrictamente regulado. Las regulaciones limitan el desarrollo de productos y procesos.

Ética	No determinante. Aplicación voluntaria.	Determinante. Esencial en experimentación animal o humana.
Intensidad de I&D	Ligado a los ciclos de producto. No intensiva.	Procesos prolongados y de investigación intensiva
Vinculación	Entre compañías e individuos.	Intensa con institutos, universidades y centros de Investigación.
Crecimiento de pequeñas empresas	Innovan y buscan la venta de su producto o de la unidad de negocio.	Las pequeñas firmas innovan y son adquiridas por empresas grandes.
Desarrollo y lanzamiento de producto	El desarrollo de producto continúa aun después de su lanzamiento al mercado.	El desarrollo de producto debe ser completado antes de su lanzamiento.
Propiedad industrial	Pocas patentes, algunas marcas. El copy right de diseño prevalece	Las patente prevalecen y el control sobre propiedad es esencial para el éxito de las compañías.

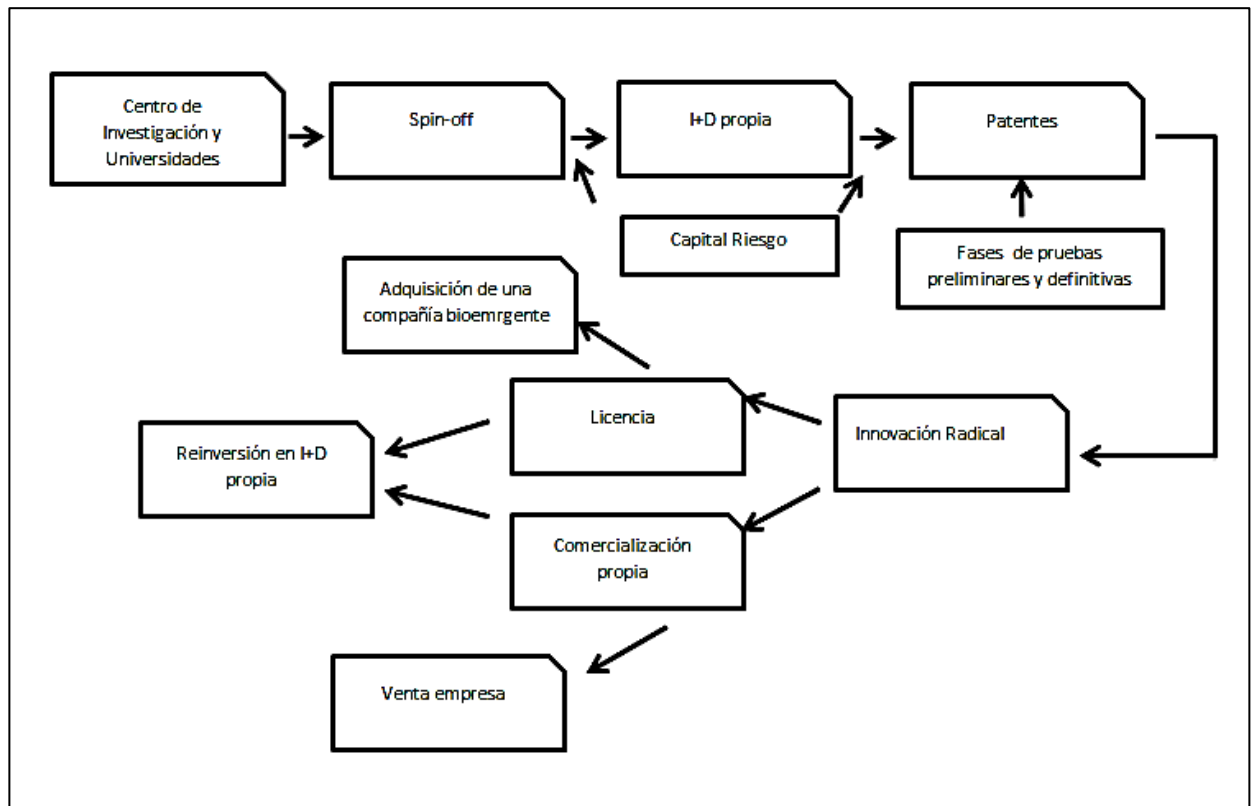
Fuente. Bergeron & Chan (2004)

## 2.3 MODELOS DE I+D+i EN BIOTECNOLOGIA EN EL MUNDO

### 2.3.1 Estados Unidos

Se centran sus esfuerzos en elevar intensidad en I+D y apoyar proyectos que tengan como fin productos y tecnologías auténticamente innovadores, con gran impacto en el terreno de la salud humana. Los otros campos de la biotecnología, como el instrumental médico, aplicaciones agroalimentarias y salud animal, no han recabado el interés de los inversionistas (Figura 4).

**Figura 4.** Modelo de Investigación, Desarrollo e Innovación Radical en Estados Unidos.

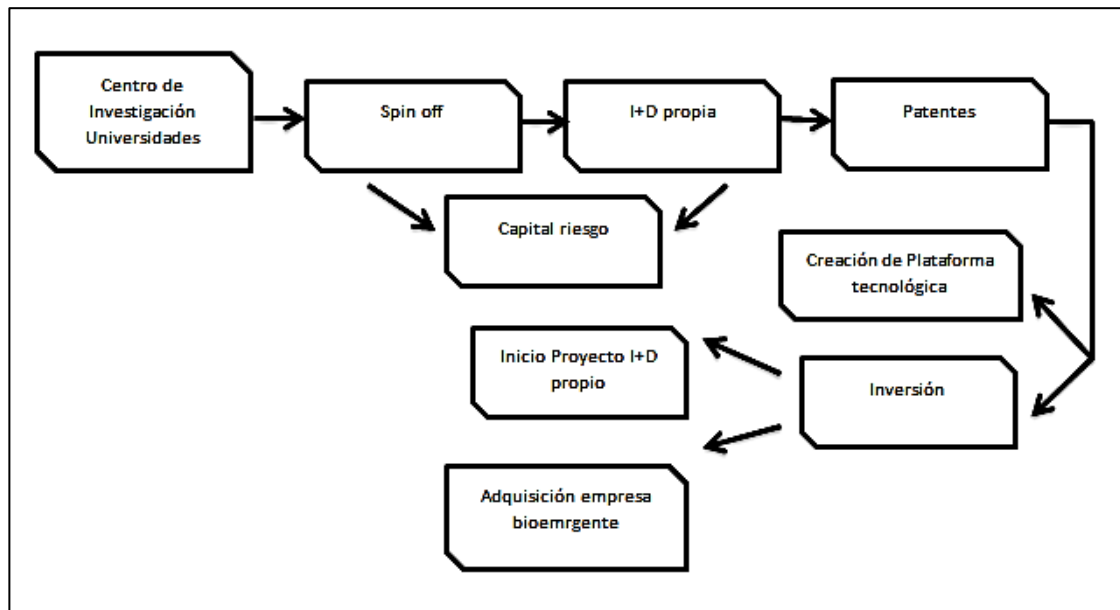


**Fuente:** March, I., Soane, R., & Yague, R. (2007).

El modelo representado en la Figura 5 demuestra que se da inicio de un estándar orientado a estructurar una nueva tecnología o instrumental, conocido como Plataforma tecnológica (proteómicas y metabolómicas) que lograra ingresos a los 3-5 años desde el inicio de las inversiones en I+D+i.



**Figura 5.** Modelo Creación plataforma tecnológica. Fuerte inversión en I+D con resultados en el medio plazo (3-5 años). Estados Unidos



**Fuente:** March, I., Soane, R., & Yague, R. (2007).

La industria de la biotecnología es un sector en crecimiento en los Estados Unidos y alrededor de 1,42 millones de personas trabajan directamente en biociencias y otros 6 millones en actividades relacionadas. El gobierno federal como los estatales ven a la biotecnología como un sector estratégico para el crecimiento económico, que genera trabajos cualificados y de salarios altos.

El mayor segmento dentro de la biotecnología es salud humana (57%), seguido de agrobiotecnología (18%), bioprocesos y biotecnología industrial (12%), salud animal y marina (8%) y la biotecnología medioambiental (8%). (Oficina Económica y Comercial Embajada de España, 2012).

En la tabla 1, se presenta las características que posee Estados Unidos para ostentar el liderazgo mundial en el mayor mercado de la biotecnología.

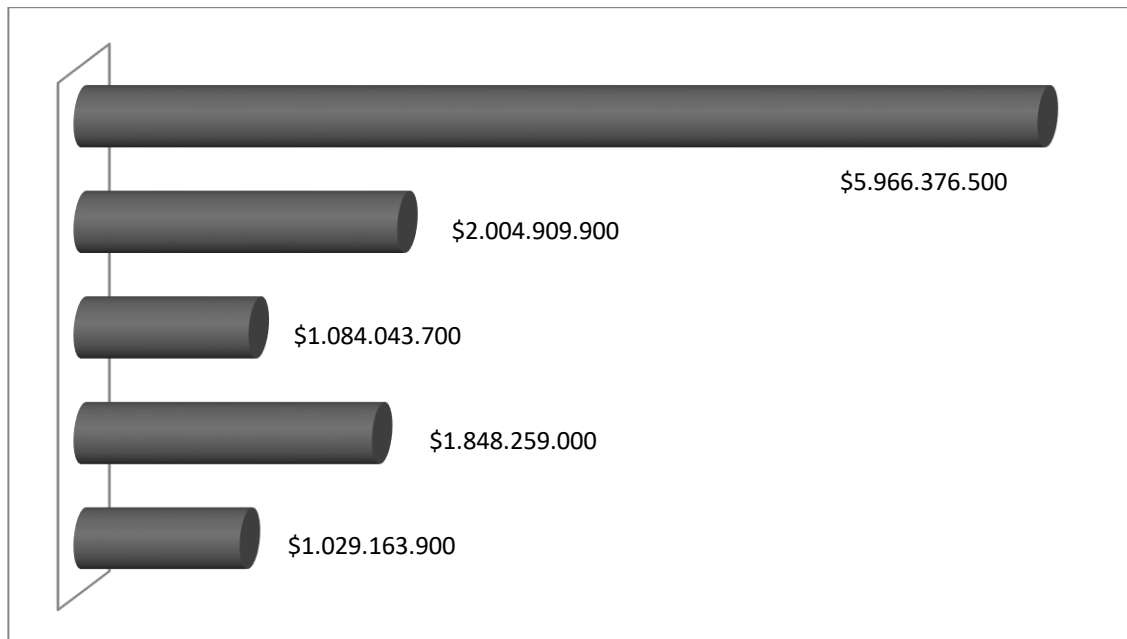
**Tabla 1.** Características del Mercado Biotecnológico en Estados Unidos

<b>Número de empresas</b>	1.843 empresas.
<b>Ingresos de empresas cotizadas en Bolsa</b>	616.000 millones de dólares (Ernst & Young, 2010).
<b>Tamaño del mercado de medicinas</b>	307.000 millones de dólares (IMS Research).
<b>Puestos de trabajo</b>	1,42 millones (Batelle).
<b>Capital riesgo</b>	4.730 millones de dólares (Money Report, de PWC,2011).
<b>Investigación y Desarrollo</b>	más de 100.000 millones de dólares entre gasto público y privado.
<b>Patentes</b>	6.601 entre las clases 424, 435 y 514(Biofarmacos-Biología Molecular y Microbiología) que engloban los productos de biotecnología (US Patent and Trademarks Office).

**Fuente:** Oficina Económica y Comercial Embajada de España( 2012).

En la figura 6, se presenta la inversión en Biotecnología para el 2014 presentó un promedio trimestral de US\$1.491.594.125 millones de dólares, evidenciándose una mayor inversión en el segundo y tercer trimestre, esto lo logra poseer en el segundo sector al cual se le inyecta más capital. En general, las inversiones en el año 2014 en el sector de ciencias de la vida (biotecnología y Productos Sanitarios combinados) aumentaron en comparación con el año 2008 con US\$ 8.6 mil millones invertidos en 789 ofertas, un aumento del 29 %, pero una caída del 3% en comparación con el año 2013 (Thomson Reuters, 2015).

**Figura 6.** Inversiones trimestrales en la Industria Biotecnológica 2014- Estados Unidos

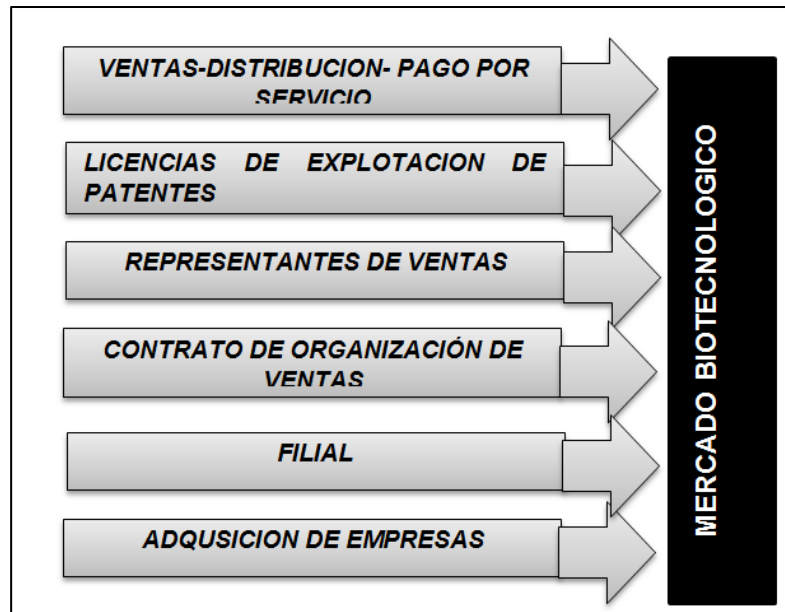


**Fuente:** Thomson Reuters (2015).

Otro factor determinante en el aumento de las inversiones son las fusiones y adquisiciones, es una tendencia que se mantenido y continuará o incluso se acelerará ya que las compañías buscan por un lado aumentar sus líneas de producto y por otro la expansión en mercados emergentes. (Oficina Economica y Comercial Embajada de España, 2012).

En la Figura 7, se presenta las condiciones de acceso al mercado biotecnológico el cual es complejo y fragmentado. Las empresas deben enfrentar costos y riesgos para poder ingresar, logrando una distribución complicada y a su vez una barrera de entrada efectiva. Se presenta casos de empresas con productos o servicios que tiene un mercado concreto por ello se recurre a la dinámica de ventas directas o pago por servicio.

**Figura 7.** Condiciones de acceso al mercado biotecnológico de EEUU



**Fuente:** Oficina Economica y Comercial Embajada de España. (2012).

Para una empresa extranjera que desee incursionar en este mercado, una de las tácticas adecuadas es el establecimiento de un acuerdo de colaboración con una empresa americana que distribuya o incorpore en su portafolio de productos y servicios los ofertados por dicha empresa.

Las empresas biotecnológicas que promocionan sus productos directamente cuenta con representantes que no se limitan a presentar los productos, sino a identificar primero las necesidades de los clientes y así ofrecerle asistencia para resolver estas necesidades.

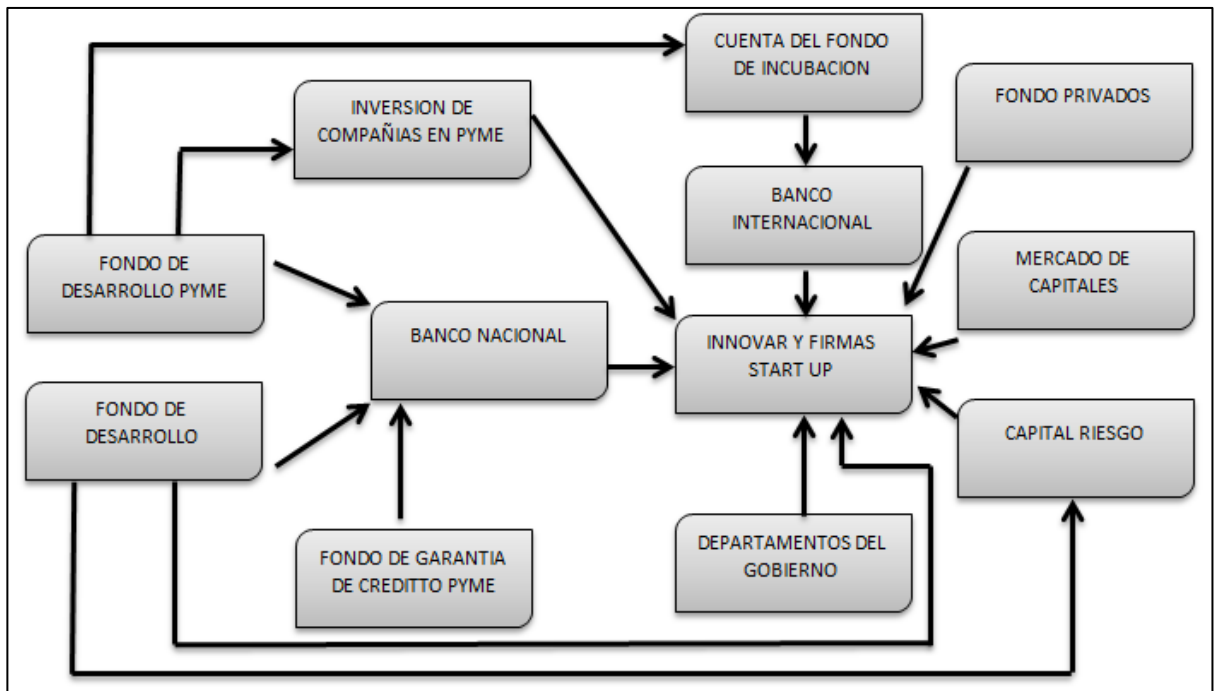
Los contratos de organización ofrecen servicios de asistencia en la venta y marketing de productos y es una figura característica del campo de la salud (farmacéuticos, productos médico hospitalarios y ciencias de la vida). Los servicios pueden ir desde call centers de atención al cliente hasta contratación y formación de agentes comerciales o gestión de la red de distribución.

La apertura de una filial en EEUU se requiere un mayor conocimiento del mercado y su vez, mayor inversión inicial. Un acelerador del crecimiento que se ha utilizado para promover el desarrollo del mercado de Estados Unidos, las empresas británicas y alemanas, entre otras, es la adquisición de una pequeña empresa del sector bien establecida ya que aportan una estructura, clientes, ciertos beneficios y posiblemente socios ya existentes y así muy bajos costos de implementación.

### 2.3.2 Taiwan

Ha implementado programas financieros específicos para apoyar el desarrollo de nuevos productos en industrias específicas, en la figura 8, se evidencia que los bancos, los fondos privados, mercado de capitales y capital de riesgo proporcionan financiación a las empresas innovadoras y empresas Star-up.

**Figura 8.** Modelo del Sistema I+D+i de Biotecnología en Taiwán



**Fuente:** Wonglimiyarat, J. (2014).

Los principales programas de apoyo del Estado incluyen desarrollo tecnológico de la industria, tecnología en el sector de servicios, comercialización de Biotecnología, entre otros.

La financiación por parte de entidades como el Fondo de Desarrollo, el Fondo de Desarrollo de las PYMES y el Fondo de Garantía de Crédito PYME han ayudado a estructurar el potencial tecnológico de las empresas locales privadas y llevar a Taiwán al nivel de los países desarrollados (Liu & Wen, 2010).

Los recursos de I + D + i del gobierno están integrados en diversos programas de becas de investigación y desarrollo para apoyar la investigación en diferentes etapas: investigación básica, la investigación aplicada, el desarrollo tecnológico y comercialización, estos programas de I + D se llevan a cabo por diversos organismos gubernamentales, universidades e institutos de investigación, así como empresas estatales y privadas para fomentar la difusión tecnológica y la aplicación a través de diversas redes de innovación (Wong, 1999).

Taiwán ha construido con éxito sus economías de innovación basadas en las políticas industriales bien planificadas y la sólida infraestructura de ciencia y tecnología, la cual es apoyo a sus empresas de base tecnológica, que desempeñan un papel activo en la economía mundial.

### **2.3.3 España**

La industria biotecnológica posee dos promotores principales del conocimiento las Universidades y Centros públicos de Investigación. El desarrollo está sujeto a la gestión y explotación de los resultados de la investigación generada en el sector público, mediante su transferencia al sector privado.

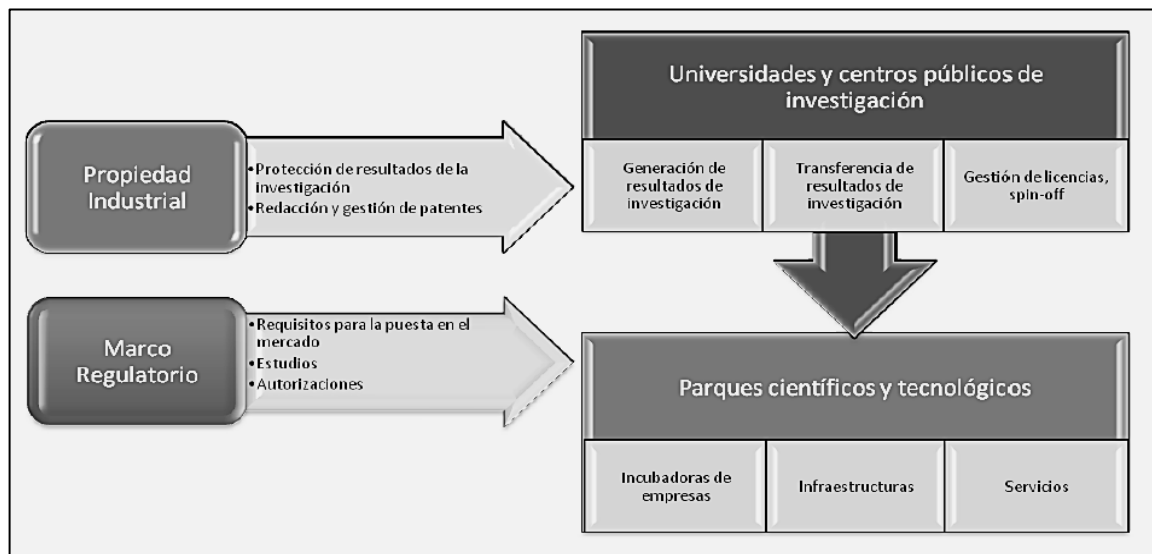
En la Figura 9, se presenta los factores clave para garantizar una transferencia del conocimiento eficaz que permita llevar al mercado productos procedentes de la investigación pública (Martin, 2014). Las Universidades y Centros Públicos de investigación han evolucionado de la investigación básica a la traslacional la cual

“ha sido definida originalmente como aquella investigación aplicada y comprehensiva que pretende traducir el conocimiento científico disponible para hacerlo útil a la sociedad” (Cabieses & Espinoza, 2011).

La creación de entidades como los Organismo Públicos de Investigación (OPIs) y la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) han logrado la generación de patentes que protejan los resultados antes de su publicación y después agilizar el aprovechamiento de los resultados.

Los Parques Científicos y Tecnológicos, son administrados por la Universidades, tienen como objetivo articular la investigación hasta el entorno empresarial. Las incubadoras de empresa, brindan: espacio en el que dan comienzo a una nueva actividad empresarial, instalaciones de uso común que suponen un gran ahorro en la inversión inicial necesaria para la puesta en marcha de una empresa de base tecnológica, las empresas incubadas tienen acceso a una serie de plataformas tecnológicas que ofertan servicios científicos y de asesoramiento que complementan aquéllos ofrecidos por las OTRIs.

**Figura 9.** Factores claves en I+D+i de Biotecnología en España.



**Fuente:** Martin, E. (2014).

En el cuadro 5, se presenta la organización del mercado Biotecnológico en España denominada Plataforma de Mercados biotecnológicos, que es el resultado del trabajo de la Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO) - Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), y cuenta con la colaboración de la Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT) y la Fundación Genoma España, entre otras entidades. El objetivo de esta Plataforma es desarrollar procesos asertivos de comunicación entre los distintos agentes del sistema ciencia-tecnología-empresa, de modo que se fomente la innovación biotecnológica, la transferencia de tecnología y su introducción a la sociedad.

**Cuadro 5.** Plataforma de Mercados Biotecnológicos en España

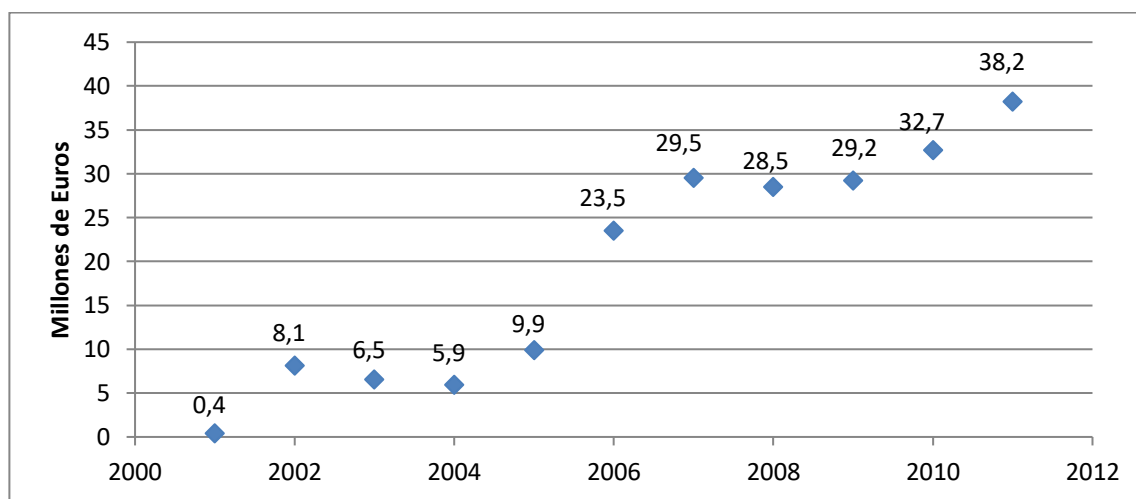
<b>AREA</b>	<b>SECTORES</b>	
<b>1. Biotecnología Roja</b>	<b>Biofármacos</b>	<b>Tecnología</b>
<b>2. Biotecnología Verde</b>	<b>Agricultura</b>	<b>Alimentación</b>
<b>3. Biotecnología Blanca</b>	<b>Biocombustibles</b>	<b>Fabricación de equipos biotech.</b>
<b>4. Servicios</b>	<b>Tecnológicos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioinformática</li> <li>• Desarrollo de kits biotecnológicos</li> <li>• Genómica</li> <li>• Metabólica</li> <li>• Nanotecnologías</li> <li>• Proteómica</li> </ul>	<b>Al sector</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Capital Riesgo</li> <li>• Consultoría</li> <li>• Empresas CRO / CMO</li> <li>• Formación</li> <li>• Ingeniería</li> <li>• RR.HH</li> </ul>

**Fuente:**Plataforma de Mercados Biotecnologicos. ( 2010).



El sector biotecnológico resulta muy atractivo para las empresas de capital riesgo, debido a su alta rentabilidad esperada. De las operaciones de inversión de capital riesgo llevadas a cabo en España en 2012, un 9,2% se han realizado en biotecnología, y como se puede observar en la figura 10, el aumento de la inversión en biotecnología ha ido evolucionando paralelamente al desarrollo del sector en España (Martin, 2014).

**Figura 10.** Evolución de la Inversión de capital riesgo en biotecnología en España en el periodo 2001-2011



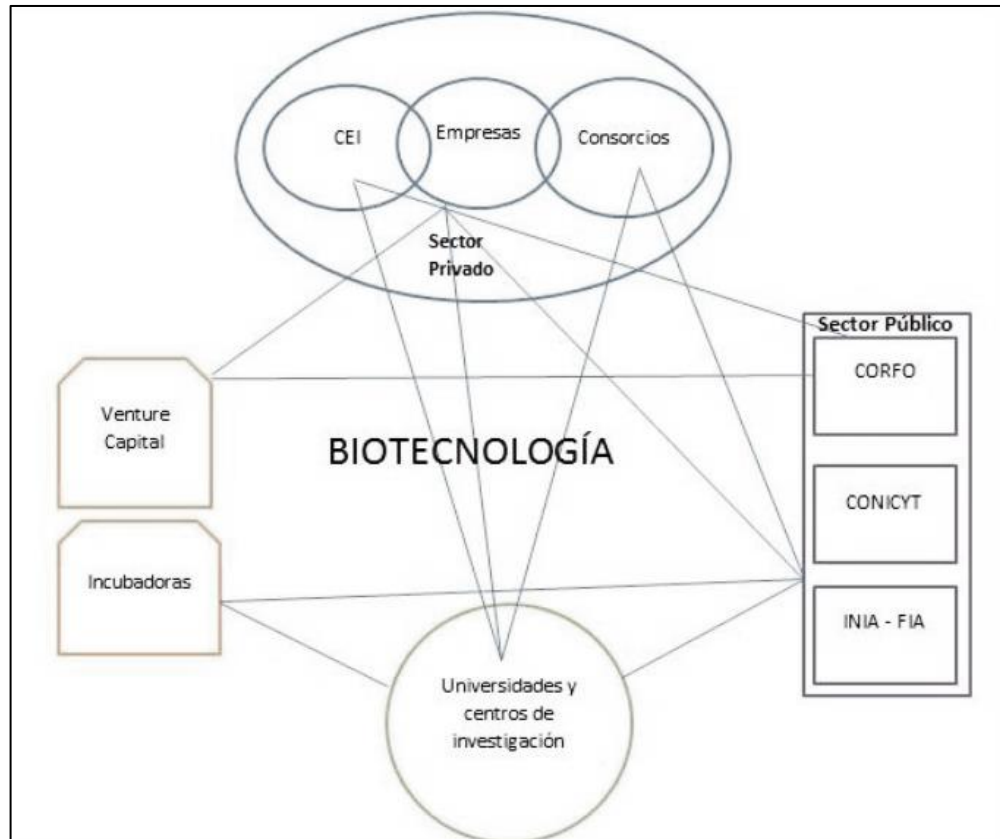
**Fuente:** Martin, E. (2014).

### 2.3.4 Chile

Los actores principales en el sector biotecnológico son: empresas, consorcios tecnológicos, centros de excelencia, entidades gubernamentales relacionadas, incubadoras, fondos de inversión, universidades y centros de investigación. Las empresas (aproximadamente 100) por su actividad, interactúan con la totalidad de participantes que están representados en la Figura 11. Los consorcios tecnológicos surgen de la unión de empresas con universidades y entidades gubernamentales. Los centros de excelencia internacional, crean espacios de transferencia tecnológica de empresas internacionales con gran prestigio y trayectoria con actores chilenos. En cuanto al financiamiento, las empresas obtienen fondos de

incubadoras, fondos de inversión, de programas patrocinados por Corporación de Fomento a la Producción - CORFO , Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica - CONICYT y Fondo de Innovación Agraria (FIA), o bien de capital propio (DGE Consulting, 2013)

**Figura 11.** Mapa de relación de los principales actores de I+D+i en Chile



**Fuente:** DGE Consulting (2013).

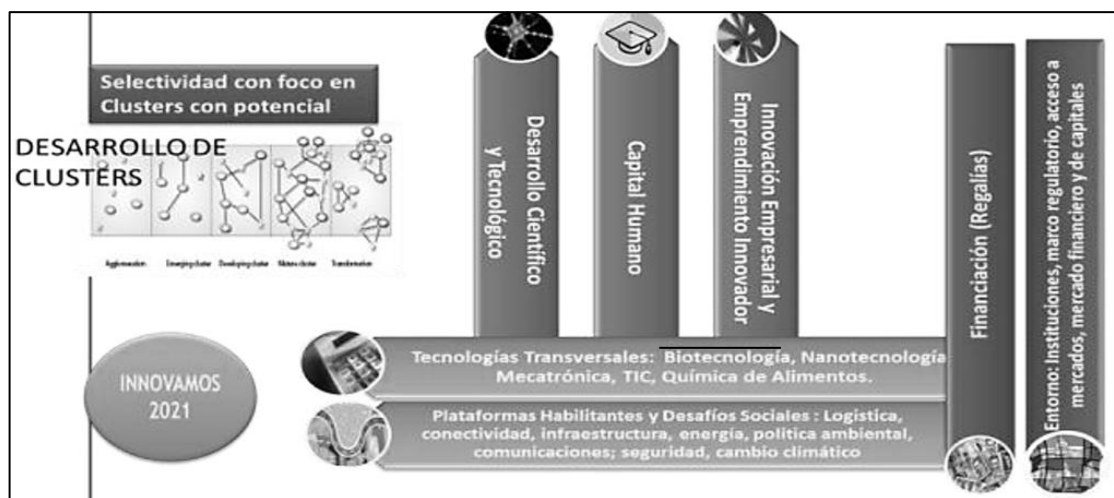
La Asociación Chilena de Empresas de Biotecnología (ASEMBIO) asegura que el sector biotecnológico en Chile ha ido creciendo fuertemente en los últimos años y se espera un crecimiento sostenido del orden del 30% anual, las ventas totales estimadas del sector son de US US\$900 millones al año y más de US US\$170 millones de inversión extranjera han ingresado en el sector.

Según la CORFO, las empresas biotecnológicas chilenas se distribuyen principalmente en el sector Agroindustrial (41%), Salud-Diagnóstico Humano (27%), el 32% restante se distribuye en empresas dedicadas a la acuicultura, alimentos, bioprocesos, biotecnología industrial, biominería y biocombustibles.

### 2.3.5 Colombia

En la Figura 12, se esquematiza la estrategia nacional de innovación en Colombia estructurado sobre tres columnas: capital Humano de Calidad a los diferentes niveles; la innovación empresarial y el emprendimiento innovador, manifestado en la existencia de una masa crítica de empresas con rutinas de innovación y una dinámica de difusión de mejores prácticas de gestión y de un entorno que promueva el emprendimiento innovador; y finalmente el desarrollo de capacidad Científica y Tecnológica relevante para abordar los desafíos del desarrollo productivo, económico y social de Colombia. Estos tres requieren plataformas habilitantes claves y retos sociales para el desarrollo de negocios innovadores en Colombia. (Bitran, Benavente, & Maggi, 2011)

**Figura 12.** Estrategia Nacional de Innovación en Colombia



**Fuente:** Bitran, E., Benavente, J., & Maggi, C. (2011)

El Servicio Nacional de Aprendizaje- SENA creó la Red de Tecnoparque Colombia que es un programa de innovación tecnológica dirigido a todos los Colombianos, que actúa como acelerador para el desarrollo de proyectos de I+D+i materializados en prototipos funcionales en cuatro líneas tecnológicas, que agrupa un conjunto de áreas estratégicas del conocimiento, sustentadas en las tecnologías emergentes, las oportunidades del sector productivo, las políticas del gobierno y los sectores de clase mundial, las cuales: Electrónica y Telecomunicaciones, Tecnologías Virtuales, Ingeniería y diseño y Biotecnología nanotecnología, que promueva el emprendimiento de base tecnológica. Los Nodos especializados en Biotecnología se encuentran en las siguientes ciudades: Bogotá, Medellín; Rionegro, Pitalito, Espinal, Manizales y Cali.

En la tabla 2, se relaciona las empresas en Colombia de base biotecnológica ciento sesenta y siete (167) distribuidas en los siguientes sectores:

**Tabla 2.** Empresas de Base Biotecnológica en Colombia.

Sector	Productos Principales	N° Empresas
Agrícola	Agente biológico para el control de plagas, inoculante biológico, bioabono, y extractos vegetales.	<b>97</b>
Alimentos y bebidas alcohólicas	Productos lácteos fermentados, bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas	<b>50</b>
Biocombustibles	Bioetanol, Biodiesel	<b>12</b>
Farmacéutico	Medicamentos biotecnológicos	<b>8</b>
<b>Total de Empresas</b>		<b>167</b>

**Fuente:** Servicio Nacional de Aprendizaje (2012).

El mercado biotecnológico en Colombia, no se ha desarrollado por las siguientes limitantes: la escasa masa crítica; el hecho de que no se asignan recursos financieros suficientes para llevar a cabo proyectos de mediano y largo plazo; el apoyo a la investigación en temáticas específicas no constituye una política de Estado sino del Gobierno de turno; y la infraestructura física y de equipos especializados es limitada (Cruz, Barrero, Rodríguez, Fernando, & Mestra, 2012).

Los elementos esenciales para alcanzar el éxito en los procesos de inclusión de nuevos productos en el mercado biotecnológico son: visión integral de la cadena de valor y no un enfoque fragmentado, logrando la comprensión de la creación de valor y estructurando logros claros (Gutiérrez, 2014). La Investigación, desarrollo e innovación, debe mantener alianzas científicas y técnicas que cubran todas las áreas del saber necesarios (Corporación Andina de Fomento, 2005). El Escalado Industrial no ha contado con una propuesta de valor demostrable, que garantice el impacto económico, social y ambiental para su comercialización, para disponer de una estrategia de gestión comercial, obteniendo capitalización y participación clara de varios actores (Cotes, Cruz, González, Borrero, & Rodríguez, 2012)

En el cuadro 6, se presenta un comparativo a nivel internacional (cinco países) de los modelos o sistema de I+D+i, en función de cuatro componentes (administración pública, Interacción estado - industria, sistema de financiación y movilidad de personal) (Quintana & Benavides, 2004) lográndose definir el desarrollo de los productos o procesos biotecnológicos en cada uno de los países referentes. Se puede resaltar que papel del estado es primordial para los avances en biotecnología ya que lograr acortar los procesos de generación, transformación y aprovechamiento de la ciencia y la tecnología.

**Cuadro 6.** Comparativo de los modelos de I+D+i

	<b>ADMINISTRACIONES PUBLICAS</b>	<b>INTERACCION ESTADO - INDUSTRIA</b>	<b>SISTEMA FINANCIACION</b>	<b>MOVILIDAD PERSONAL/SISTEMA DE EDUCACION CIENTIFICA</b>
<b>ESTADOS UNIDOS</b>	<p>Ley de patentes de EE.UU. en relación con la biotecnología, no hay exclusión estatutaria para elementos específicos.</p> <p>Alta protección de la propiedad intelectual.</p> <p>Exigencias altas para la aprobación de productos biotecnológicos (fármacos).</p>	<p>Proceso de transformación rápido de los proyectos científicos a prácticas comerciales y en la creación de un nuevo estilo emprendedor innovador.</p> <p>Transferencia de conocimientos fue canalizada a través de acuerdos de colaboración formales entre Universidad y empresa.</p> <p>Establecimiento de nuevas pequeñas empresas dedicadas a la biotecnología (start-up) en forma de spin-offs.</p> <p>Capital riesgo tanto público como privado</p>	<p>Poseen una gran financiación destinada a la innovación.</p> <p>Créditos impositivos para incentivar las actividades de I+D.</p>	<p>Empleados firman acuerdos de confianza para proteger tecnologías específicas.</p> <p>Los científicos y gerentes tienen libertad de movimiento para ir de unas empresas a otras</p>
<b>TAIWAN</b>	<p>Programas de apoyo del estado incluyen desarrollo tecnológico de la industria, tecnología en el</p>	<p>Empresas Start-ups</p> <p>Acuerdos de cooperación inter-</p>	<p>Entidades como el Fondo de Desarrollo, el Fondo de Desarrollo de</p>	<p>Programas de becas de investigación y desarrollo para apoyar la investigación</p>

	sector de servicios, comercialización de biotecnología.	empresarial en I+D Colaboración entre organizaciones de investigación.	las PYMES y el Fondo de Garantía de Crédito PYME.	en diferentes etapas: investigación básica, la investigación aplicada, el desarrollo tecnológico y comercialización, estos programas de I + D se llevan a cabo por diversos organismos gubernamentales, universidades e institutos de investigación del estado y privados.
<b>ESPAÑA</b>	Posee entidades como los Organismos Públicos de Investigación (OPIs) y la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI).	Parques Científicos y Tecnológicos, son administrados por las Universidades, tienen como objetivo articular la investigación hasta el entorno empresarial.	Programas de financiación por parte del Estado.	Formación de personal propio de la empresa o fuera de ellas y aceptación de científicos en régimen temporal.
<b>CHILE</b>	CORFO ofrece programas de: Protección de la propiedad intelectual Inclusión de recursos humanos especializados	Empresas Start-ups Programa de Desarrollo e Innovación Tecnológica (PDIT). (Universidad	fondos de incubadoras, fondos de inversión, de programas patrocinados por Corporación de Fomento a	Centros de excelencia internacional, crean espacios de transferencia tecnológica de empresas internacionales

	Integración de la innovación en la cultura organizacional de la empresa y sector público Difusión de tecnologías y conocimientos a diferentes sectores productivos Mejoramiento de recursos humanos.	estado empresa).  Acuerdos de cooperación inter-empresarial en I+D.	la Producción- (CORFO) , Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) y Fondo de Innovación Agraria (FIA).	con gran prestigio y trayectoria con actores chilenos.
<b>COLOMBIA</b>	Ajustan y actualizan la normatividad acceso a los recursos genéticos y sus derivados(propiedad intelectual y patentes)  Promoción de bioincubadoras y laboratorios de investigación biotecnológica.	Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA) posee Red de Tecnoparque Colombia para el desarrollo de proyectos I+D+i del sector productivo .	Fondo Francisco José Caldas, alimentado por los siguientes sectores Públicos: Presupuesto general de la Nación, Fondo Nacional de Regalías, Ministerios, Gobernaciones, etc. Multilaterales: Banco Mundial, BID y EU Privadas: Empresas privadas.	Jóvenes Investigadores e Innovadores Estudios de doctorado en Colombia y el exterior Intercambio internacional de investigadores Movilidad internacional de investigadores e innovadores Capacitación de gerentes innovadores y personal dedicado a actividades de I+D en el exterior.

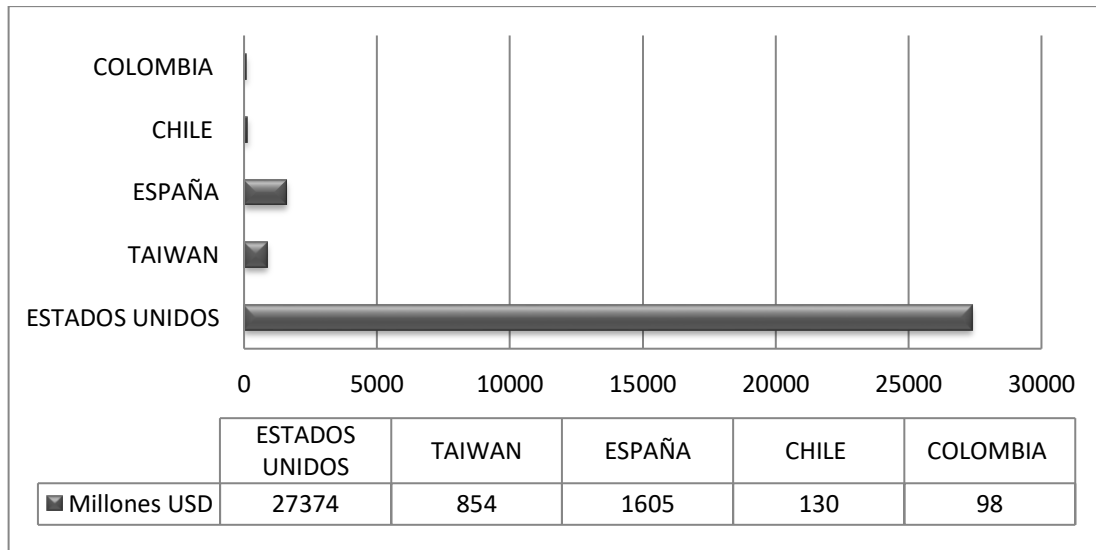
**Fuente:** Propia del autor.

En la Figura 13 se presenta la inversión (pública-privada) que han hecho los países en las actividades de I+D+i, notándose en este comparativo que Estados Unidos y España ocupa el primer y segundo lugar , seguidos en orden Taiwán, Chile y



Colombia, el motivo principal de inversiones tan altas como es el caso de Estados Unidos ya que cuenta con políticas soporte a la innovación, el efecto conjunto sobre el stock de conocimiento tanto en el sector público como privado, y sobre el flujo y transferencia de tecnología entre universidades y sector productivo, sumado a esto se ha generado una nueva clase de emprendedor intelectual que combina dinamismo y flexibilidad, logrando una rápida transferencia de los avances científicos a la industria y un mercado bursátil y de capital riesgo propicio (Quintana & Benavides, 2004).

**Figura 13.** Inversión en I+D+i en Biotecnología 2011-2013



**Fuente:** Propia del autor.

### **3. METODOLOGIA DE DISEÑO DE PRODUCTO**

#### **3.1 GENERALIDADES DE DISEÑO DE PRODUCTO**

Con el diseño de productos se busca la mejor solución a un problema planteado. En general, los problemas que se presentan son considerados abiertos desde el punto de vista de la ingeniería, quiere decir que estos admiten múltiples soluciones; a una de ellas se considera la mejor. Por mejor se entiende la que satisface simultáneamente una serie de restricciones (tiempo, costo, calidad, entre otros) en cierto modo opuesta, y optimiza un conjunto de criterios de selección.

En el 2001, Grech considera que las actividades que se deben realizar en el proceso de diseño con las siguientes:

- Definición del problema.
- Establecimiento de los criterios de selección.
- Búsqueda de información pertinente.
- Generación de la mayor cantidad de soluciones posibles.
- Análisis y descarte de las soluciones que no son viables
- Selección de la mejor solución entre las que quedaron.
- Especificaciones de la solución seleccionada para su producción o manufactura.
- Comunicación escrita sobre la solución seleccionada

En general el proceso de diseño tendrá muchas entradas y a lo sumo dos salidas: la documentación y un prototipo. Son entradas del diseño las exigencias y regulaciones aplicables al producto, las cuales deben estar documentadas desde su inicio. Para evitar requerimientos inconsistentes se hace necesario el uso de

herramientas que apoyan el proceso de diseño como lo son QFD, FMEAS, DOE y entre otras (Villamil & Garcia, 2003).

Al final de cada paso del diseño se debe comprobar que los objetivos parciales comprometidos en esa etapa han sido logrados.

La verificación del diseño tiene la intención de proporcionar la certeza de que los resultados de una actividad de diseño han cumplido los requisitos de entrada para esa actividad y puede comprender actividades como: cálculos alternativos, comparar una especificación nueva de diseño con una especificación de diseño similar ya probada, realizar demostraciones incluyendo prototipos, simulaciones o pruebas y revisión de los documentos antes de su emisión ( INLAC, 2011).

Los procesos de validación del diseño permiten confirmar que el producto resultante puede satisfacer los requisitos para el uso planificado. En los casos posibles, la validación concluirá antes de la entrega o aplicación del producto. De no poderse hacer la validación completa antes de la entrega o aplicación, se realizará, en la medida de lo posible, una validación parcial. Las actividades de validación pueden incluir: revisiones que involucran a otras partes interesadas, estudios de modelación- simulación y pruebas de aspectos claves de un producto y/o servicio (Raigorodsky, Torres, & Diaz, 2002).

### **3.2 INGENIERIA CONCURRENTE (IC)**

Carlson (2002), considera que la ingeniería concurrente la han definido por cada uno de los acercamientos teóricos o prácticos que sobre ella se han realizado; dándole una gran variedad de denominaciones tales como ingeniería simultánea, ingeniería cooperativa, diseño integrado de procesos y productos, diseño concurrente, etc.

Dando sus inicios en 1980 y por vez es definida en 1986 por el Instituto para Análisis de Sistemas de Defensa de los EE. UU como “una aproximación al diseño concurrente, integrado de productos y a sus procesos relacionados, incluyendo fabricación y soporte. Esta aproximación pretende que quienes desarrollan el producto consideren todos los elementos del ciclo de vida del producto desde su concepción hasta su desaparición, incluyendo calidad, costo, tiempo y necesidades del usuario”.

La ingeniería concurrente, cambia totalmente el enfoque tradicional secuencial de diseño y fabricación de producto por una visión simultánea en paralela, logrando disminuir el número de procesos vinculados en serie. Reduciendo el esfuerzo total que se invierte en llevar un producto desde su concepto hasta el momento de la entrega, teniendo en cuenta las necesidades tanto de los consumidores como de los clientes industriales (Gomez, 2010).

En 1996 Prasad, estableció los principios básicos de la IC permitiendo identificar las características de un proceso inmerso en esta metodología, los cuales son:

- Trabajo estructurado.
- Aprovechamiento del conocimiento común entre los miembros de cada equipo y entre los equipos de trabajo.
- Estimulación del trabajo en equipo.
- Toma temprana de decisiones de fabricación.
- Descubrimiento temprano de problemas.
- Conservación del propósito por parte de todo el personal vinculado a los procesos.
- Sentido de propiedad, en tanto que el proyecto es resultado de la concertación.

En el cuadro 7, se plantea los factores claves para implementación exitosa teniendo claro que se debe aplicar la metodología de forma sistemática en la empresa u organización.

**Cuadro 7.** Factores del diseño concurrente para el diseño de productos

<b>FACTORES</b>	<b>DEFINICION</b>
<b>Cliente</b>	Orientación hacia la práctica de escuchar la voz del cliente
<b>Proceso</b>	Mejora del proceso mediante la planificación del diseño, del proceso y del producto
<b>Integración interna /externa</b>	Combinación del diseño, la fabricación y la comercialización mediante los requisitos del cliente y las especificaciones para el proveedor.
<b>Gestión</b>	Mejora de la organización, mediante las actividades de diseño, administración y producción de un bien.
<b>Producción</b>	Mejora de los medios de fabricación del producto, mediante la programación y el control
<b>Seguridad</b>	Garantiza la seguridad en los procesos, el medio ambiente y el hombre, mediante disposiciones y normativas
<b>Comunicación</b>	Efectividad del proceso, mediante un plan idóneo de comunicación.

**Fuente:** Adaptado de Kinna (2007).

### **3.3 DESPLIEGUE DE LA FUNCION DE LA CALIDAD (QFD)**

El Despliegue de la Función Calidad (QFD- Quality Function Deployment) pretende lograr un diseño de Productos o Servicios de Calidad escuchando la “Voz del Cliente” de forma científica, y posteriormente garantizar que dicha información pasa a las Características del Producto o Servicio.

La mayor parte de técnicas de calidad se ocupan de la Calidad de Conformidad, es decir, de la eficacia en el cumplimiento de unas especificaciones previamente

establecidas. El QFD se dirige hacia el diseño de la calidad, ya que permite establecer desde la óptica del cliente cuál es la calidad que necesitan los productos o servicios.

El QFD se desarrolló en Japón durante los años 60 por el Profesor Yoji Akao. Actualmente se ha masificado por todo el mundo, con aplicaciones en los distintos sectores de actividad industrial y de servicios.

Según Muños en el 2007, define que el QFD involucra dos principios: el formato y el comportamiento organizacional. En el formato, se determina que exista una estructura de trabajo establecida, apoyándose en la generación de información y documentación de la misma.

El comportamiento organizacional se debe fundamentar en equipos de trabajo multidisciplinario que toman decisiones en consenso. Se podría presentar que se tome una decisión en función de las recomendaciones de un experto en el tema. Cabe resaltar que también existe un principio que predomina en esta metodología que es la capacidad y destreza para el manejo de grupos y de información que facilite las sesiones de trabajo.

En el cuadro 8, presenta los factores del QFD que definen los requisitos y los procesos de planeación del diseño con el fin de cumplirle al cliente y aumentar la productividad.

**Cuadro 8.** Factores de QFD para el diseño de productos

<b>FACTORES</b>	<b>DEFINICION</b>
<b><i>Requisitos del cliente</i></b>	Necesidades y expectativas manifestadas por el cliente
<b><i>Requisitos técnicos</i></b>	Características relevantes y medibles del producto

<b><i>Planeación del diseño</i></b>	Traducción de las especificaciones de diseño del producto
<b><i>Planeación del proceso</i></b>	Traducción de las especificaciones de parámetros de proceso.
<b><i>Planeación del producto</i></b>	Traducción de las especificaciones de características de calidad del producto.

**Fuente:** Adaptado de Olaya & Otros (2005).

La metodología de QFD permite ordenar la información obtenida del usuario hasta llegar a definir las características de calidad del producto/servicio. Según Gutiérrez (2009), las fases en las que se desarrolla QFD son las siguientes:

1. Identificar y jerarquizar a los clientes:

- Comprender a los clientes considerando sus expectativas.
- Seleccionar segmentos de usuarios para realizar el despliegue de calidad demandada y planificada.

2. Identificación de las expectativas del cliente

- Conocer las expectativas del cliente a través de la siguientes herramientas
  - Grupos de discusión.
  - Informes sobre quejas.
  - Estudios existentes en base a encuestas realizadas.
  - Informes de responsables de puntos de venta.
  - Publicaciones y artículos.
  - Informaciones sobre la competencia.

3. Conversión de la información en descripciones verbales específicas

- Los datos obtenidos según la herramienta son pocos precisas, para ello debe analizarse y ajustarlas en medidas concretas.

4. Elaboración y administración de la encuesta a clientes.
  - Aplicar la encuesta estructurada a los usuarios (que conozcan también la competencia).
  
5. Despliegue de la calidad demandada.
  - Obtener datos.
  - Generar cuadro de la calidad demandada.
  - Generar cuadro de la calidad planificada.
  - Determinar en qué aspectos hay que comprometer mayor esfuerzo, que hay que mejorar, en función de la situación actual de la organización y de la competencia.
  
6. Despliegue de las características de calidad
  - Identificar elementos susceptibles a mejora.
  - Elaboración de lista de indicadores (hecha por un grupo interdisciplinar).
  - La lista resultante deberá ser exhaustiva y consistente.

### **3.4 CALIDAD DESDE EL DISEÑO (QbD)**

En 1992 Joseph Juran en su libro *“On quality by design: the newsteps for planning quality into goods and service”* acuña por primera vez el termino calidad desde el diseño (Quality by Design –QbD), considerándose como un enfoque sistemático que pretende la comprensión de los procesos y por ende de los productos, además del el control, todo esto se basa en sólidos principios científicos y de gestión de calidad.

La calidad desde el diseño toma elementos desarrollados décadas atrás por diferentes expertos de la calidad y de la gestión del conocimiento compartiendo principios de metodologías de desarrollo de producto y de gestión de la calidad,



como lo son ; inspección del producto , control de la calidad, aseguramiento de la calidad, gestión de la calidad, gestión total de la calidad (TQM) y estos han evolucionado para fortalecer el enfoque holístico de la calidad (Garcia, Vallejo, & Claudia, 2015).

La *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*, considera QbD como una metodología adecuada para el desarrollo farmacéutico, que parte de objetivos predefinidos, haciendo énfasis en el conocimiento del producto y en la comprensión y el control de los procesos.

En el 2004, la Food and Drug Administration (FDA), planteo a QbD como una metodología clave para el aseguramiento de la calidad, ya que concibe construir la calidad de los producto desde el desarrollo e incluyendo los procesos de manufactura. Aportando en la cultura de la práctica habitual de evaluar la calidad durante el proceso de fabricación o en el producto final (*QbT, Quality by Testing*), proporcionando argumentos y análisis para toma de decisiones acerca de qué parámetros de producto y proceso deben ser controlados. (Fraser & Kerboul, 2012).

Teniendo en cuenta el aporte que significa su implementación, en términos del cumplimiento de exigencias como validación de procesos productivos, el enfoque de QbD forma parte integral de guías tales como las: Q8, “Desarrollo de productos farmacéuticos, Q9, “Gestión del riesgo en calidad” y Q10, “Sistema de calidad farmacéutico” que fueron desarrolladas por el ICH. (Rosas, 2012)

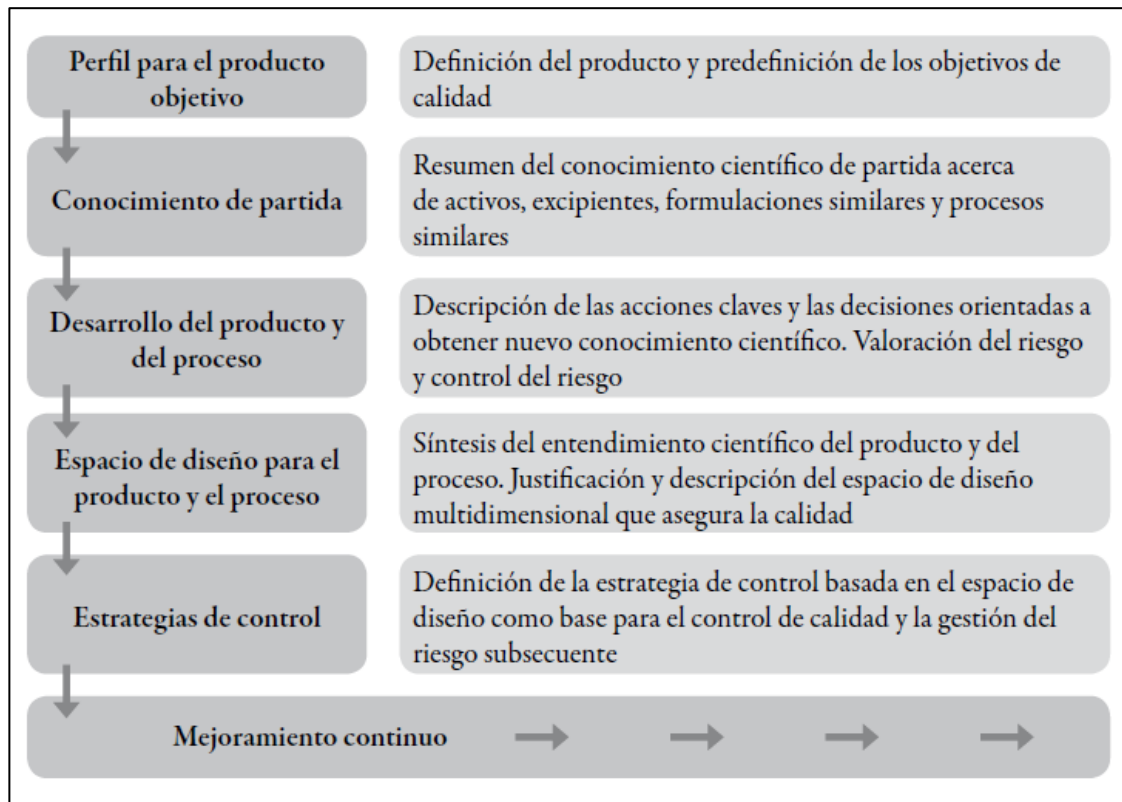
La guía técnica Q8 contiene las directrices para la implementación de los principios de QbD , los cuales son (ICH, 2009):

- Definir el perfil del producto objetivo de calidad (QTPP) teniendo en cuenta calidad, seguridad y eficacia.
- *Definir de los atributos críticos de calidad (CQAs).*

- *Determinar los (CQAs) que afectan significativamente el producto.*
- Selección de un proceso de fabricación apropiada
- Definir la estrategia de control.

En la figura 14, se resume como se debe implementa la calidad desde el diseño, requiere definir adecuadamente el producto y los objetivos de calidad que se perseguirán en su diseño. Igualmente, es necesario disponer de un adecuado conocimiento de los conceptos teóricos y los aspectos prácticos asociados al tipo de producto. Esto servirá de base para identificar los atributos críticos de calidad del producto (*CQA, critical quality attribute*), los atributos críticos de los materiales de partida (*CMA, critical material attribute*) y los parámetros críticos de control del proceso (*CPP, critical process parameter*), para efectuar los análisis de riesgo de producto-proceso y para planear el conjunto de actividades de desarrollo de productos que se consideren pertinentes. Sobre esta base se estandariza el proceso productivo, en donde se estiman los espacios de diseño (*DS, design space*) para los diferentes parámetros críticos del proceso, entendidos estos como los criterios de aceptación de las variables de entrada de cualquier operación unitaria y que aseguran el mismo resultado en las salidas. Igualmente, en la estandarización del proceso se definen las estrategias de control (Rocha, Cuadro, & Mora, 2013).

**Figura 14.** Metodología de calidad basada en el diseño QbD para el desarrollo de productos.



Fuente: Rocha, Cuadro & Mora (2013)

### 3.5 BIOMECATRONICA

El desarrollo industrial y la fabricación de productos electromecánicos complejos abarcan una gran variedad de logros de la ingeniería, que van desde aplicaciones a gran escala hasta los dispositivos altamente miniaturizados. Muchos instrumentos y dispositivos biotecnológicos son complejos, ya que son incorporados células o biosensores los cuales al interior del biorreactor se transforman.

En la ingeniería mecánica, la metodología de diseño está bien reconocida y se utiliza para la formación en las escuelas de ingeniería en todo el mundo. Los dos elementos clave son: la generación de soluciones conceptuales para el problema

de diseño; y el análisis de las funciones y estructuras para soluciones alternativas. Uno de los métodos reconocidos para generar y analizar las soluciones de diseño es la teoría Hubka-Eder para el diseño conceptual.

Hubka y Eder formularon la teoría en los años 80, donde solo contemplaron principalmente el diseño de productos para la industria mecánica, que normalmente incluye productos de consumo como máquinas de café, automóviles, tornos eléctricos y camiones pesados. En ese momento, los productos biotecnológicos no se consideraron.

Esta teoría puede ser adaptada para los procesos de transformaciones intermediadas por biomoléculas, enzimas o células. Por lo tanto, los sistemas biológicos podrían ser considerados como partes de los sistemas técnicos, o tal vez mejor, una entidad propia de sus sistemas. Por ejemplo, un biorreactor de laboratorio se puede representar en el modelo Hubka-Eder con su transformación de nutrientes y medios de cultivo. El inóculo es el sistema biológico activo y el recipiente del reactor con las bombas y el impulsor comprenden los sistemas técnicos. Electrodo y medidores de flujo forman los sistemas de información. El software de control con la interfaz del operador es el sistema de gestión y los operadores sirven como los sistemas humanos (Mandenius & Björkman, 2010).

Esta metodología facilita y organiza el trabajo de desarrollo de productos mediante el uso de procedimientos simples, herramientas y modelos (Mandenius C.-F. , 2012), los cuales se citan a continuación:

- Establecer de forma concisa la misión de diseño.
- Identificar las necesidades de los usuarios del producto/proceso del usuario. Estas se han especificado con los valores objetivos.

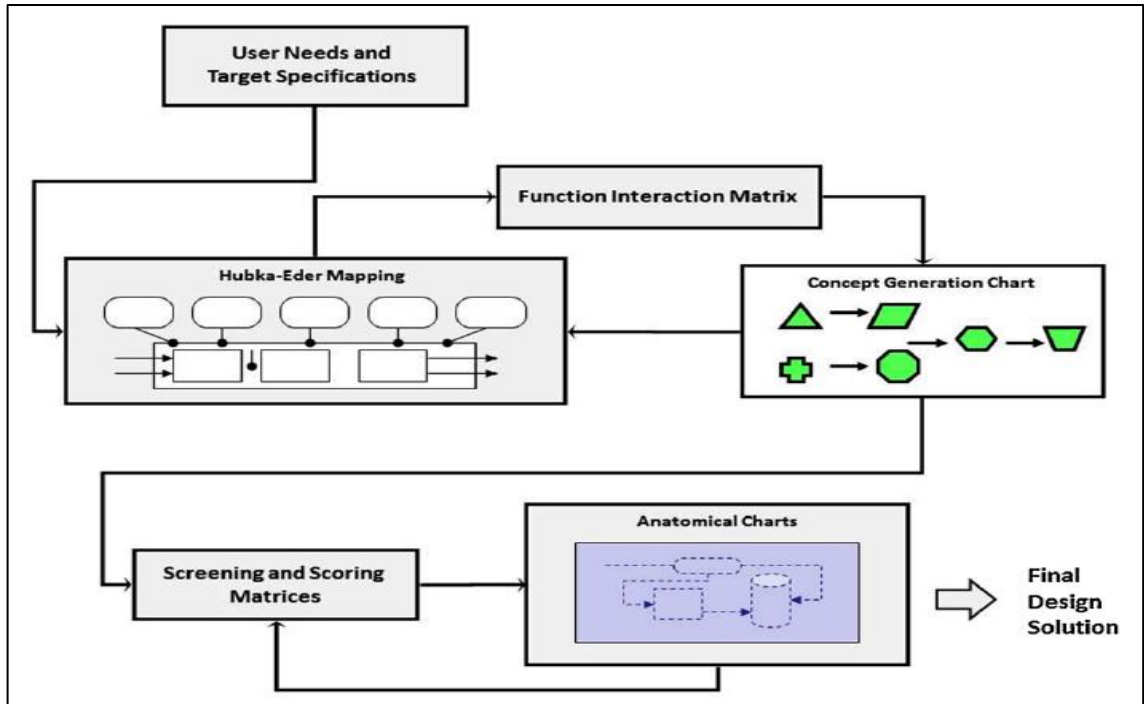
- Con la ayuda de estas especificaciones se construye un diagrama de flujo de la información (mapa Hubka-Eder) que muestra las funciones necesarias para el cumplimiento de las especificaciones.

Este gráfico busca representar los componentes funcionales abstractos que se combinan en la mayor cantidad de alternativas (permutaciones) lo cual es clave en el diseño y es considerada como la generación de un concepto real. La generación del concepto está apoyada por una matriz de interacción que ayuda a determinar la importancia de los efectos entre los sistemas y funciones.

- Posteriormente, las alternativas conceptuales generadas son evaluadas y se obtiene las métricas destino.
- Con una o dos conceptos que quedan después de la evaluación, los prototipos son construidos y probados a través de pruebas exhaustivas.

En la figura 15, se presenta el flujograma de la metodología aplicada en el diseño mediante la Biomecatrónica.

**Figura 15.** Metodología aplicado en Diseño Biomecatronico



**Fuente:** Mandenius & Björkman(2011).

#### 4. DISEÑO MEDIANTE LA METODOLOGIA BIOMECATRONICA DE UN PRODUCTO BIOTECNOLOGICO A BASES DE MICROORGANISMOS AUTOCTONOS

La producción de biomasa (inoculante) con potencial biodegradador, como es el caso del *Bacillus spp*, se lleva a cabo por fermentación líquida obteniendo , por lo general, buenos resultados. Este tipo de microorganismo transforma las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio y microelementos en metabolitos de interés como lo son: células microbianas, enzimas, polisacáridos y metabolitos secundarios, los cuales no son esenciales para el crecimiento en el cultivo de producción, pero sirven en diversas funciones para la supervivencia en la naturaleza.

*Bacillus subtilis* es una bacteria autóctona del suelo que se desarrolla en diferentes hábitats y que ha logrado establecerse debido a las siguientes características: capacidad de producir esporas, crecer en un intervalo amplio de temperaturas, movilidad por flagelos peritricos, aerobios estrictos en su mayoría, altas tasas de crecimiento, producción de enzimas hidrolíticas extracelulares y una gran variedad de antibióticos. Sneath (1986) los definió como bacilos Gram positivo, que pueden estar individualmente u organizados en cadena, con una temperatura de crecimiento de 15°C a 55°C.

Este microorganismo se puede producir a gran escala en medio líquido, bajo condiciones de agitación y aireación establecidas con anterioridad. Además, se puede hacer crecer en medios líquidos económicos, donde se logran obtener de buenos a excelentes rendimientos en función de las células o del metabolito de interés. De acuerdo a la forma de producción de *B. subtilis* se pueden obtener distintos productos: en polvo, metabolitos secundarios, antibióticos y bioinsecticidas

(Ramirez, 2011). *B. subtilis*, es inocuo, no es considerado patógeno o toxigénico de los humanos, animales, o plantas, por lo que el potencial riesgo asociado al uso de este, en instalaciones industriales es bajo (Giacaman, 2006). Además, el género *Bacillus spp* es uno de los grupos más importantes de microorganismos industriales y se utiliza en varios procesos de fermentación. (Chen, Tian, Lin, Huang, & Li, 2013). Por lo tanto, la operación y el control de la fermentación es crucial en la obtención del producto biotecnológico de interés.

Para que el proceso de fermentación se desarrolle de forma adecuada se debe determinar un medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos. Se considera el establecimiento de parámetros como el pH, temperatura, oxígeno disuelto, entre otros, con el propósito de que el microorganismo se desarrolle y obtener así el producto de interés. La producción del inoculante microbiano de *Bacillus spp* se llevará a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

*Obtencion del inóculo:* se desarrolla en la etapa de pre- fermentación, donde el cultivo preservado se reactiva inicialmente en cultivo líquido en agitación, en condiciones adecuadas para la fermentación posterior.

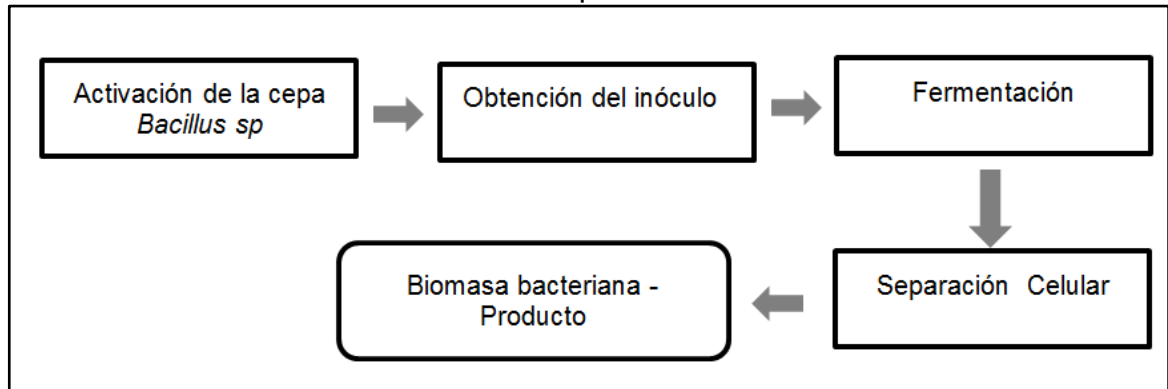
*Fermentacion batch:* el medio de produccion se inocula con el microorganismo de interés y se controla para que se lleve a cabo la fermentación en condiciones óptimas y no se adicionan nutrientes además del oxígeno y sustancias reguladoras de pH. Durante este proceso la concentración de biomasa, el medio de producción y la producción de células cambian como resultado del metabolismo microbiano.

*Separación celular :* se recupera la biomasa a través de filtración o centrifugación que son las dos operaciones típicas en esta fase.

En la figura 16 se ilustra el esquema del procedimiento en el laboratorio de investigación.



**Figura 16.** Producción de Inoculante microbiano (*Bacillus spp*) mediante operación batch o por lotes.



**Fuente:** Propia del autor (2016).

#### **4.1 DEFINICIÓN DE ESPECIFICACIONES OBJETIVOS PARA LA FERMENTACIÓN Y BIOSEPARACIÓN DEL PRODUCTO**

Se determinaron las especificaciones objetivos a través de la revisión de literatura especializada de la producción de *Bacillus subtilis*, prevaleciendo consideraciones técnicas de operación y de calidad, los cuales son vitales en el proceso de escalado de bioprocesos que incluyen las condiciones medio ambientales (pH, temperatura, oxígeno disuelto, densidad celular), los criterios de operación (agitación, aireación, coeficiente volumétrico de masa, estrés por cizallamiento) que están asociados a los fenómenos de transferencia de masa, energía y cantidad de movimiento para la célula, y por último el control de calidad (tiempo de producción, concentración final de células viables, limpieza y mantenimiento), los cuales se relacionan en la tabla 3.

Para la bioseparación sólido – líquido (BSL) en la tabla 4 se encuentran definidos los parámetros asociados a las propiedades de salida del medio de producción (tamaño de la partícula, densidad, viscosidad, etc.) y proceso (flujo y modo de operación).

**Tabla 3.** Condiciones de operación para la producción del inoculante – 100L

<b>PARÁMETROS</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>VALORES OBJETIVOS</b>	<b>FUENTE</b>
<b>Ph</b>	Unidades de pH	7+/-0.2	(Ramírez 2011) (Zhang, 2011) (Ravindar & Elangovan, 2013)
<b>Temperatura</b>	°C	33+/-3	(Ramírez 2011) (Zhang, 2011) (Ravindar & Elangovan, 2013) (Zhong et al., 2014) ( Meng et al .,2015)
<b>Oxígeno Disuelto</b>	mg/L	2	(Ramírez 2011)
<b>Densidad Celular</b>	absorbancia	≈ 0.5	(Hernández, 2003)
<b>Volumen del inóculo</b>	% del volumen de trabajo	1-10	(Zhang, 2011) (Ravindar & Elangovan, 2013) ( Meng et al .,2015)
<b>Agitación</b>	rpm	150 -200	(Ramírez 2011) (Zhong et al., 2014) ( Meng et al .,2015)
<b>Tasa de Aireación</b>	V V M L/s	1 2	(T. Matsumoto et al.,2000) (Zhong et al., 2014)
<b>Coefficiente volumétrico de masa <math>K_{La}</math></b>	s <sup>-1</sup>	0.04-0.08	(Yeh, Wei, & Chang, 2006) (Fahim et al .,2012)
<b>Estrés por cizallamiento</b>	Pa	0.2–0.6	(Mandenius ,2012)
<b>Tiempo de Producción</b>	horas	20-22 por batch	(Hernández,2003) (Ramírez ,2011)
<b>Concentración final de células viables</b>	UFC/ml	3 x 10 <sup>9</sup>	(Yañez-Mendizàbal,2012) (Meng et al.,2015)
<b>Material compatible con el cultivo microbiano</b>	--	Acero inoxidable 316L	(Lydersen et al.,1994)
<b>Seguimiento y control</b>	--	En línea / muestreo frecuente	Propia del autor
<b>Limpieza y mantenimiento</b>	--	Mínima intervención	(Barrera, 2004).

Fuente: Autor, (2016)

**Tabla 4.** Parámetros objetivos para la bioseparación sólido-líquido (BSL)

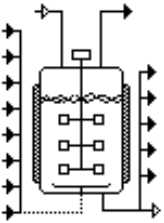
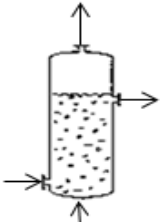
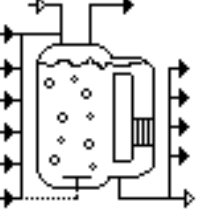
<b>PARÁMETROS</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>VALORES OBJETIVOS</b>	<b>FUENTE</b>
<b>Tamaño de la partícula</b>	µm	0.5 a 2.5 µm x 1.2-10 µm.	(Koneman,2001)
<b>Densidad</b>	g/cm <sup>3</sup>	1.0915 +/- 0.0215	(Lune-Finkler & Finkler, 2008)
<b>Viscosidad</b>	N-s/m <sup>2</sup>	2.682x 10 <sup>-3</sup>	(Tejeda, Montesinos, & Guzman, II Recuperacion del Producto, 2011)
<b>Velocidad de sedimentación</b>	cm/min	2.9	(Lune-Finkler & Finkler, 2008)
<b>Porcentaje de sólidos</b>	%	0.5 - 5	(Tejeda, Montesinos, & Guzman, II Recuperacion del Producto, 2011)
<b>Tipo torta</b>	--	Compresible	(Tejeda, Montesinos, & Guzman, II Recuperacion del Producto, 2011)
<b>Flujo</b>	L/min	8-120	(Tejeda, Montesinos, & Guzman, II Recuperacion del Producto, 2011)
<b>Descarga de sólidos</b>	--	intermitente	Propia del autor.
<b>Porcentaje de separación</b>	%	90	Propia del autor.
<b>Modo de operación</b>	--	Lote	Propia del autor.
<b>Limpieza y mantenimiento</b>	--	Mínima intervención	(Barrera, 2004).
<b>Esterilidad</b>	--	Si	Propia del autor.

**Fuente:** Propia del autor.

## 4.2 ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE LAS PROPUESTAS DE LA CONFIGURACIÓN DEL BIORREACTOR Y LA UNIDAD DE BIOSEPARACIÓN.

El análisis biomecatrónico se inició con la determinación de las especificaciones objetivos para el biorreactor y la bioseparación sólido-líquido como se evidenció anteriormente. A continuación se determinaron los tipos de fermentadores que podrían definir la configuración funcional del biorreactor, teniendo como criterio de selección los más empleados en los procesos de producción de biomasa. Las tres alternativas de los biorreactores fueron: tanque agitado, columna de burbujeo y air-lift (ver cuadro 9).

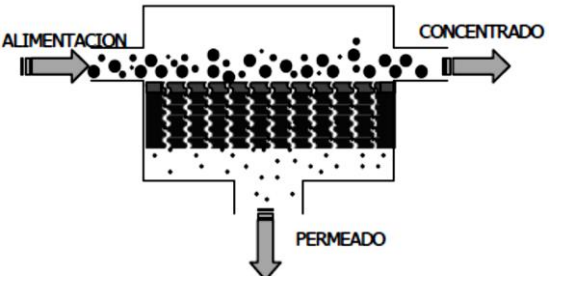
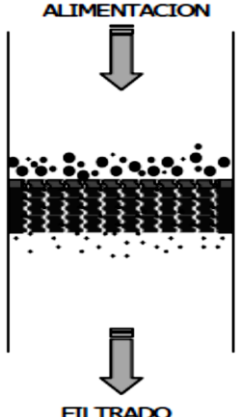
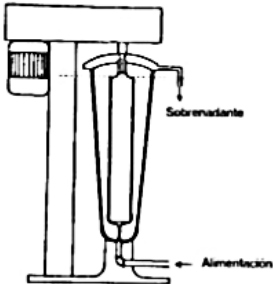
**Cuadro 9.** Características de los Bioreactores a evaluar

<p style="text-align: center;"><b>TANQUE AGITADO</b></p> 	<p>Se utiliza generalmente para cultivos aeróbicos cuya concentración del sustrato tiene un comportamiento decreciente en el transcurso del tiempo. Es flexible y adaptable. Amplia intensidad de mezclado. Maneja medios de alta viscosidad.</p>
<p style="text-align: center;"><b>COLUMNA DE BURBUJEO</b></p> 	<p>Su hidrodinámica y demás características dependen del comportamiento de las burbujas formadas en el difusor. Simple, no posee partes móviles. No garantiza un buen mezclado. Limitado a sistemas de baja viscosidad.</p>
<p style="text-align: center;"><b>AIRLIFT</b></p> 	<p>La característica que lo diferencia de los de columna de burbujeo es que las corrientes de flujo están más definidas debido a la separación física de las corrientes ascendentes y descendentes. Simple, no posee partes móviles. No garantiza un buen mezclado. Limitado a sistemas de baja viscosidad.</p>

**Fuente:** Adaptado de Doran, 1998.

Se aplicó el mismo procedimiento para el proceso de bioseparación, seleccionándose la filtración y la centrifugación (ver cuadro 10) puesto que son las operaciones básicas más empleadas en la separación celular.

**Cuadro 10.** Características de los procesos de Bioseparación sólido-líquido a evaluar.

<p style="text-align: center;"><b>MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL</b></p> 	<p>Coulson y Richardson (2002), la definen como el líquido que atraviesa la membrana, denominado permeado, y que contiene los componentes o partículas de menor diámetro. Los diámetros de poro oscilan entre 0.1 y 10 micras, según el tipo de componente que se desee retener. La alimentación —fluye paralela a la membrana.</p>
<p style="text-align: center;"><b>MICROFILTRACIÓN FRONTAL</b></p> 	<p>El líquido que entra en contacto de forma perpendicular con la superficie de la membrana es forzado a pasar a través de ella. Algunos sólidos y componentes quedarán retenidos por la membrana mientras el resto pasará al otro lado. El líquido gradualmente experimentará una mayor resistencia a pasar a través de la membrana, debido a la acumulación de sustancias.</p>
<p style="text-align: center;"><b>CENTRIFUGACIÓN TUBULAR</b></p> 	<p>Consiste en un tubo vertical que gira a altas velocidades por la acción de un motor eléctrico o turbina. Es uno de los métodos más eficientes y sencillos. La operación es intermitente. La suspensión es alimentada por la parte inferior y los sólidos sedimentan en la pared del tubo (Tejeda, Montesinos, &amp; Guzman, 2011).</p>

Fuente: Propia del autor.

Con esta información se genera una matriz de evaluación donde se confrontan los parámetros objetivos con los tipos de bioreactores y operación básica según el caso, para identificar correlaciones positivas/neutras/negativas entre ellos y esta a su vez tiene asociado un puntaje, como se establece en la tabla 5. Esto da como resultado una clasificación donde se selecciona como la mejor opción la que presente el mayor puntaje de las alternativas de diseño.

**Tabla 5.** Puntaje correlaciones

<b>PUNTAJE</b>	<b>CORRELACIÓN</b>
<b>3</b>	Relación positiva fuerte
<b>1</b>	Relación positiva moderada
<b>0</b>	Sin relación
<b>-1</b>	Relación negativa moderada
<b>-3</b>	Relación negativa fuerte

**Fuente:** Propia del autor.

En la tabla 6, se presenta la evaluación de los parámetros objetivos para las alternativas de la producción de biomasa, donde la asignación de puntaje fue dada por las experiencias reportadas en literatura especializada. El biorreactor tipo tanque agitado obtuvo el primer lugar dentro de la clasificación, basándose en las buenas experiencias reportadas por varios investigadores en la producción de biomasa de esta especie bacteriana y que a su vez lograron validar la generación de otros metabolitos de interés industrial y con algunas modificaciones en su diseño (Potumarthi, Ch, & Jetty, 2007; Wu, Chou, & Shih, 2013; Khondeea, et al., 2015; Rangarajan, Dhanarajan, & Sen, 2015; Santos da Silva, Faria Soares, Silva Lima, & Costapinto Santana, 2015). Su éxito se debe a su facilidad de ajustarse a cualquier escala de producción y para una variedad de procesos sin cambios en el diseño. En el segundo lugar, se encuentra el bioreactor tipo Airlift para el cual se han reportado casos exitosos en la producción de células bacterianas con rendimientos similares al tanque agitado, lo cual lo hace una alternativa interesante (Huang,

Wang, & Wu, 2001; Kunamneni, Taadimalla, Prabhakar, Jyothi, & Ellaiah, 2007; Chiang & Chiang, 2013). Uno de sus principales problemas es el deficiente mezclado, dado que las corrientes de flujo son aleatorias (Suh et al.,1992) produciendo variaciones en las condiciones medioambientales y afectando la biosíntesis de los productos biotecnológicos. En el tercer y ultimo lugar, se ubica el bioreactor columna de burbujeo, el cual se ha empleado en la producción de metabolitos diferentes (ácido cítrico, calcitonina, xilitol) a la biomasa de la especie microbiana de interés por diferentes investigadores (Tisnadjaja, Gutiérrez, & Maddox, 1996; Dilsen et al., 2001; Branco et al., 2007). Estos reactores se pueden aplicar en procesos microbiológicos que no requieran tasas considerables de transferencia de oxígeno, por lo que se han sugerido para el cultivo células vegetales (Guevara, 2004), y su uso se ha masificado en el tratamiento de aguas residuales.

**Tabla 6.** Evaluación de los parámetros objetivos para las alternativas de la producción de biomasa.

<b>PARÁMETROS OBJETIVOS</b>	<b>TIPOS DE BIOREACTOR</b>		
	<b>TANQUE AGITADO</b>	<b>COLUMNAS DE BURBUJEO</b>	<b>AIR-LIFT</b>
<b>Ph</b>	3	3	3
<b>Temperatura</b>	3	3	3
<b>Oxígeno Disuelto</b>	3	-3	2
<b>Densidad Celular</b>	1	1	3
<b>Agitación</b>	3	-3	-3
<b>Tasa de Aireación</b>	3	-3	3
<b>Coefficiente volumétrico de masa <math>K_{La}</math></b>	3	1	3
<b>Estrés de corte</b>	-1	3	3
<b>Tiempo de Producción</b>	1	1	1
<b>Concentración final de células viables</b>	3	3	

<b>Material compatible con el cultivo microbiano</b>	3	3	3
<b>Seguimiento y control</b>	3	3	3
<b>Limpieza y Mantenimiento</b>	3	3	3
<b>SUMA</b>	30	15	25
<b>POSICIÓN</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

**Fuente:** Propia del autor.

En la tabla 7, se presenta la evaluación de los parámetros objetivos para las alternativas de bioseparación de las células bacterianas, donde la asignación de puntaje fue dada por las experiencias reportadas en literatura especializada, ocupando el primer lugar la microfiltración tangencial, pues en esta se logra la separación gracias al tamaño del poro de la membrana, recuperación de macromoléculas, además elimina turbidez y los microorganismos, e impide el paso de partículas coloidales en suspensión, lo cual ha masificado su uso en la industria de alimentos, farmacéutica, biotecnológica y tratamientos de aguas (Zhoua, Ni, Huang, Zhang, & Jiandong, 2006; Ferreira Albania et al., 2015; Gerardo, Zanain, & Lovitt, 2015). En el segundo lugar, se ubica la centrifugación tubular, la cual es empleada por su diseño sencillo y por su eficiencia, y es capaz de separar partículas hasta 0.1  $\mu\text{m}$ ; además cuenta con un sistema de enfriamiento por lo cual es empleada en el manejo de caldos con enzimas o proteínas (Tejeda, Montesinos, & Guzman, 2011). En el tercer lugar, se clasifica la microfiltración fontral teniendo una baja puntuación debido a que su aplicación es limitada por la acumulación de partículas sobre la membrana y por la formación de una torta en la superficie del medio filtrante, generando que los rendimientos caigan rápidamente y aumentando la resistencia a la filtración.



**Tabla 7.** Evaluación de los parámetros objetivos para las alternativas de bioseparación de las células bacterianas.

<b>PARÁMETROS</b>	<b>MICROFILTRACIÓN TANGENCIAL</b>	<b>MICROFILTRACIÓN FRONTAL</b>	<b>CENTRÍFUGA TUBULAR</b>
<b>Tamaño de la partícula</b>	3	3	3
<b>Densidad</b>	3	3	3
<b>Viscosidad</b>	3	3	3
<b>Velocidad de sedimentación</b>	3	1	3
<b>Porcentaje de solidos</b>	1	-1	3
<b>Tipo torta</b>	3	-3	3
<b>Flujo</b>	3	3	3
<b>Descarga de sólidos</b>	3	-3	-3
<b>Porcentaje de separación</b>	3	3	3
<b>Modo de operación</b>	3	-3	3
<b>Limpieza y mantenimiento</b>	3	-3	3
<b>SUMA</b>	31	3	27
<b>POSICIÓN</b>	1	3	2

Fuente: Propia del autor.

#### **4.3 SIMULACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN SELECCIONADA**

La simulación del proceso se realizó mediante el software *SuperPro Designer* versión 9.0, el cual es ampliamente empleado pues facilita el modelado, evaluación

y optimización de procesos integrados en una amplia gama de industrias (farmacéutica, biotecnológica, química especializada, tratamiento de aguas residuales, etc.). Las características principales de este simulador son:

- Modelos para más de 140 operaciones unitarias.
- Módulos rigurosos de reactores.
- Balance de materia y energía.
- Extensa base de datos de compuestos químicos, equipos y recursos.
- Dimensionamiento de equipos y cálculo de costos.
- Análisis económico completo del proceso.
- La programación de las operaciones por lotes.
- Análisis de rendimiento y formación de cuello de botella.
- Caracterización de flujo de residuos.
- Evaluación de impacto ambiental.

El uso de este simulador permitió en este proyecto minimizar los cálculos complejos propios del proceso de ingeniería reduciendo el tiempo para el desarrollo, permitió evaluar diferentes alternativas del proceso generando el análisis de una gran variedad de ideas interactivamente en periodos cortos de tiempos facilitando la toma de decisiones, ya que los datos arrojados por el software permiten un análisis metódico del proceso propiciando confiabilidad en los resultados final de la simulación.

Una desventaja que se logró evidenciar es su base de datos, esto se debe a que no es posible tener una base de datos que contenga todos los elementos que se requieren durante el desarrollo de una simulación. Se hace necesario agregarlas en la base de datos para poder así realizar la simulación. Una vez ingresado el componente a la base de datos del programa, se deben verificar o actualizar sus

propiedades termodinámicas o agregar una propiedad no existente y que es necesaria para la operación unitaria a simular.

El éxito en los resultados de una buena simulación depende en gran parte de las condiciones que el usuario ingrese como datos, ya que estas condiciones facilitarían o bloquearían las corridas de los modelos. Es vital precisar e ingresar las especificaciones a cada uno de los equipos, es necesario agregar las operaciones que realizara cada uno, después de agregarlas se procede a realizar las especificaciones de cada una de esas operaciones.

Previamente se establecieron las condiciones de operación de cada una de las etapas así como las especificaciones de los equipos del proceso (ver cuadro 11), para finalmente analizar los reportes arrojados por el software y posteriormente tener un costo estimado la producción del inoculante microbiano (producto biotecnológico).

**Cuadro 11.** Configuración General de Simulación

<b>MICROORGANISMO</b>	<b>TIPO DE BIOREACTOR</b>	<b>TIPO DE BIOSEPARACIÓN</b>	<b>MODO DE OPERACIÓN</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	Tanque agitado – STR	Microfiltración tangencial	Lote o Batch

**Fuente:** Propia del autor.

En la tabla 8, se presenta la composición del medio de producción, el cual aportará las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre y magnesio, que posteriormente serán transformados por la acción microbiana en metabolitos, energía y biomasa. En este caso el medio de cultivo de obtención del inóculo es el mismo de producción.

**Tabla 8.** Composición del medio de producción adaptado de Giacaman (2006).

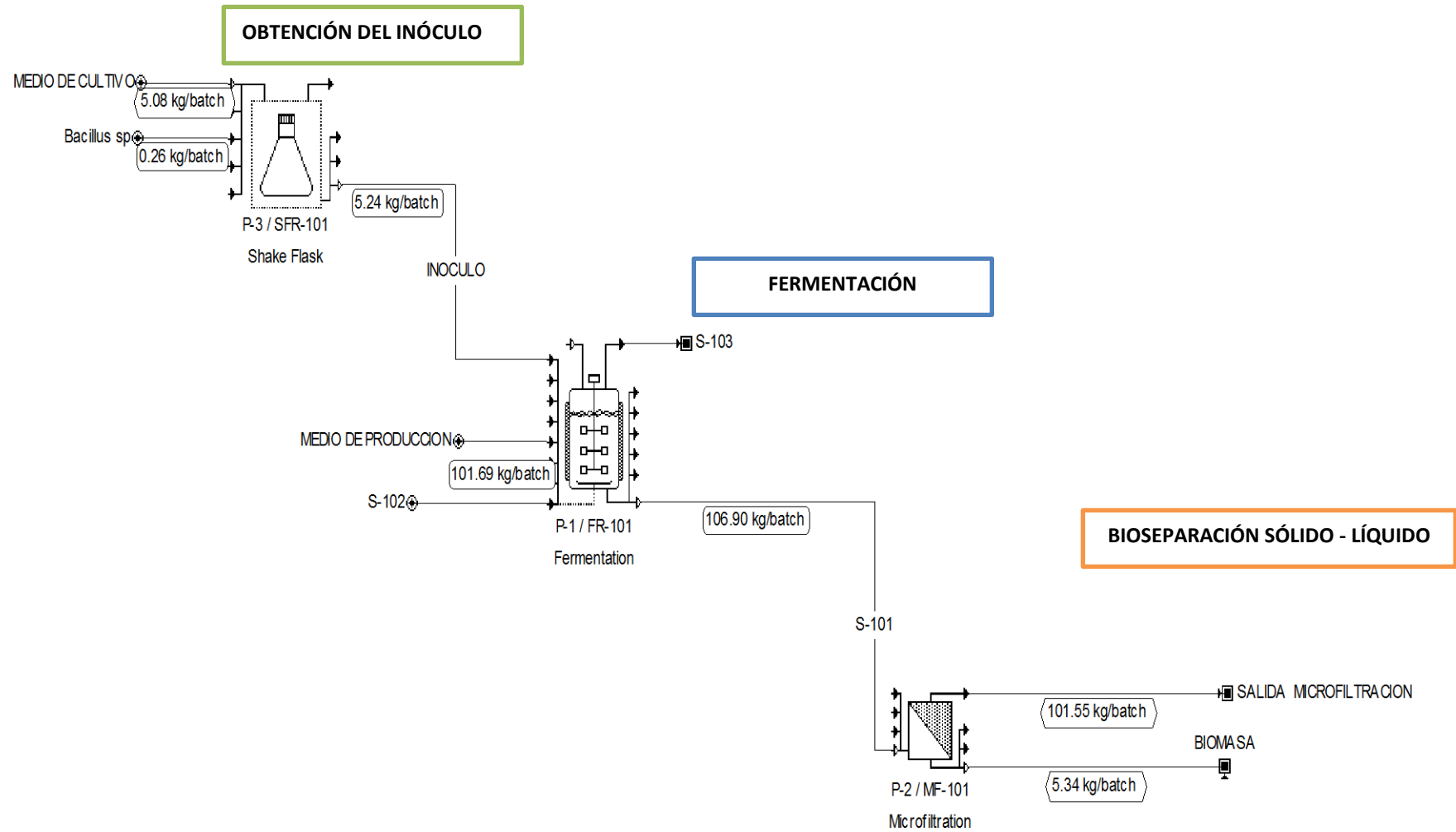
COMPONENTE	FÓRMULA	g/L
Melaza	--	40
Sulfato de Amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.37
Fosfato de potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.13
Extracto de levadura	--	10
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.232
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2$	5
Agua	$\text{H}_2\text{O}$	944.268
pH	7.0 +/- 0.2	

Fuente: Propia del autor.

En la figura 17; se presenta el flujograma elaborado con el software *Superpro Designer*, según el cual, al estar en las condiciones proyectadas, el inóculo se transfiere al bioreactor de tanque agitado, el cual debe estar esterilizado y cargado con el medio de producción. Después de haberse cumplido el tiempo de producción en el cual se ha llegado a la máxima concentración de biomasa bacteriana, se traslada el medio de producción a la unidad de microfiltración donde se separa el líquido de la biomasa generada en la etapa anterior.

En la tabla 9, se relacionan las condiciones de ingreso que se programaron en cada una de las etapas y en la tabla 10, se presenta el balance estequimétrico de la simulación de la fermentación en un reactor de 100 litros.

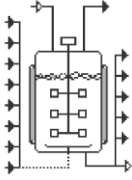
Figura 17. Diagrama de flujo de producción de inoculante -100 L



Fuente: SuperPro Designer, (2016)

**Tabla 9.** Condiciones de operación para la producción del inoculante – 100L

ETAPA	SECUENCIA DE OPERACIÓN	DATOS DE OPERACIÓN										
		CONDICIONES DE OPERACIÓN			VOLUMEN		MANO DE OBRA			PROGRAMACIÓN		
		CANTIDAD	TIEMPO DE PREPARACIÓN	TIEMPO DE PROCESO	MÁXIMO	MÍNIMO	MANO DE OBRA	CANTIDAD	UNIDAD	SERVICIO	DEPENDENCIA	TIEMPO DE ENTREGA
 P-3 / SFR-101 Shake Flask	CARGA DE NUTRIENTES	10 L	5 min	5 min	90 %	10%	operador	1	Labor-horas/ciclo	Operación	N.A	11 min
	CARGA DE MORG	1 L	5 min	5 min	90 %	10%	operador	1	Labor-horas/ciclo	Operación	Carga de nutrientes	21 min
	REACCIÓN	N.A	5 min	24 h	90 %	10%	operador	1	Labor-horas/ciclo	Operación	Carga de microorganismo	24 h con 16.03 min
	TRANSFERIR A P1	10 L	5 min	5 min	90 %	10%	operador	1	Labor-horas/ciclo	Operación	N.A	24 h con 26.03 min
	CARGA DE MEDIO PROD.	100 L	5 min	24 min	90 %	10%	operador	1	Labor-horas/ciclo	Operación	N. A	24 h con 48.31 min

 <p>P-1 / FR-101 Fermentation</p>	ESTERILIZACIÓN	100 (Kg/h) m <sup>3</sup>	5 min	30 min	N.A	N.A	operador	1	Labor-horas/ciclo	Operación	Carga de medio de producción	25 h con 23.31 min
	TRANSFERIR INOCULO	N.A	5 min	5 min	90 %	10%	operador	1	Labor-horas/ciclo	Operación	Esterilización	25 h con 20.03 min
	FERMENTACIÓN	36°C Inyección de aire 1 VVM	5 min	24 h	80%	15%	operador	1	Labor-horas/ciclo	Operación	Transferir inculo	49 h con 55.03 min
	TRANSFERIR A P2	100 L	60min	4h	90%	10%	operador	1	Labor-horas/ciclo	Operación	Fermentación	51 h con 20.03 min
 <p>P-2 / MF-101 Microfiltration</p>	CONCENTRACIÓN	N.A	5 min	4 h	N.A	N.A	operador	1	Labor-horas/ciclo	Operación	Transferir a P2	54 h con 20.03 min

Fuente: Propia del autor.

**Tabla 10.** Balance estequimétrico de la fermentación en un reactor de 100 litros.

REACTIVOS				PRODUCTOS			
COMPONENTE	COEFICIENTE MOLAR	PESO MOLECULAR	COEFICIENTE DE MASA	COMPONENTE	COEFICIENTE MOLAR	PESO MOLECULAR	COEFICIENTE DE MASA
SULFATO DE AMONIO	1	132.13	132,1340	BIOMASA	16.29	24,630	401,2786
CLORURO DE CALCIO	1,000	110,983	110,9830	DIÓXIDO DE CARBONO	9,6859	44,010	426,2786
EXTRACTO DE LEVADURA	1,000	180,160	180,1600	AGUA	10,9086	18,015	196,5177
FOSFATO DE POTASIO	1,000	136,077	136,0770	--	--	--	--
SULFATO DE MAGNESIO	1,000	246,469	246,4690	--	--	--	--
MELAZA	1,000	218,252	218,2520	--	--	--	--
<b>TOTAL MASA</b>			<b>1024.075</b>	<b>TOTAL MASA</b>			<b>1024.075</b>

Fuente: Propia del autor.



#### 4.4 RESULTADOS DE LA SIMULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE *Bacillus subtilis*

Se realizó la simulación del proceso en *Superpro Designer 9.0*, de acuerdo a las condiciones establecidas anteriormente, para finalmente valorar las variables técnicas, económicas y medioambientales de la producción del inoculante. Las corridas a diferentes escalas permitieron visualizar la factibilidad del proceso, lográndose un comparativo a nivel de tiempo de producción, materias primas, evaluación económica y generación de residuos.

Partiendo que un año tiene aproximadamente 330 días laborales equivalentes a 7882.15 horas y operando la planta de producción del inoculante microbiano, con tres turnos diarios, con 147 batch/año con un tiempo de producción 53.44 h por batch y con producción anual de 38.87 kg de biomasa (escala 4 L).

Para las escalas de 10L, 100L, 1,000L y 10,000L de volumen de trabajo en el fermentador las capacidades de cada planta son 233.14, 2251.13, 22605.30 y 222913.84 kg/año respectivamente. En la tabla 11, se presentan los datos globales del proceso resaltando que se mantienen las condiciones de operación para todas las corridas simuladas.

**Tabla 11** .Datos globales de proceso de producción.

	<b>PBs 10L</b>	<b>PBs 100L</b>	<b>PBs 1000L</b>	<b>PBs 10000L</b>
Tiempo de operación anual	7902,72h	7918,84 h	7918,57 h	7902,04 h
Producción Anual	233.14 kg	22,51.13 kg	22,605.30	22,2913.84 kg
Tamaño del Batch	0.76 kg	7.50 kg	75.35 Kg	753.09 kg
Tiempo por batch	54.45 h	55.14 h	54.87 h	56.16 h

Tiempo por ciclo	25.8 h	26.30 h	26.30 h	26.59 h
Número Batch/año	305	300	300	296

Fuente: Propia del autor.

Se evidencia que el proceso que requiere el menor número de batch al año es la producción de 10,000L, debido a que los tiempos de la separación (microfiltración) son más extensos pues es mayor la cantidad a procesar. El tamaño del batch es la cantidad de producto que se logra en el proceso, o sea en cada batch. Los tiempos por batch y por ciclo difieren en que un batch es el tiempo total en el que se desarrolla el proceso de un lote de producción mientras que un ciclo es el tiempo en el que se puede empezar un nuevo batch, implicando que los equipos que se emplean en la etapa final del proceso no son los que se utilizan en la etapa inicial; es por ello que sin haber terminado el anterior proceso se puede iniciar a operar otro batch.

En la tabla 12, se relaciona la información arrojada en las simulaciones en función de la cantidad, en kg/año, de materia prima necesaria y producto generado en cada escala, observándose que los consumos mayoritarios de materia prima fueron, en primer lugar el agua, seguida de la melaza y el extracto de levadura. En el Anexo 1 se presenta el Informe de materiales y corrientes para cada una de las corridas, tal como lo arroja el software.

**Tabla 12.** Cantidad de materia prima y producto arrojado en la simulación del proceso de producción de *Bacillus subtilis* (kg/año).

	<b>PBs 10L</b>	<b>PBs 100L</b>	<b>PBs 1000L</b>	<b>PBs 10000L</b>
<b>Materia primas ( kg/año).</b>				
Melaza	116	1,317	13,222	127,990
Extracto de levadura	30	329	3,302	32,578
Sulfato de amonio	15	145	1,454	14,349
Fosfato de potasio monobásico	3	37	376	3,706
Sulfato de magnesio. Heptahidratado	1	8	56	762
Cloruro de Calcio	15	164	1,662	16,394
Agua	2,777	31,464	315,869	3,118,106
Inoculo	28	315	3,150	3,1080
<b>Producto (kg/año).</b>				
Biomasa	205,63	2.251.13	22,605.30	222,913.84

**Fuente:** Propia del autor.

El costo de la materia prima está supeditado a los requerimientos de producción y la tasa de retorno de cada proceso depende de los gastos de compra de materia

prima y de los ingresos por venta del inoculante. En la tabla 13, se listan los costos (en dólares americanos) de la materia prima tomados a partir del análisis económico de las diferentes escalas simuladas y resaltándose que las tres materias primas correspondientes al extracto de levadura (36,32%), el inóculo (31,32%) y la melaza (21,92%) equivalen al 88,73% de los costos de la materia prima.

**Tabla 13.**Costos materia prima.

<b>MATERIA PRIMA</b>	<b>COSTO U US\$/kg</b>	<b>PBs 10L</b>	<b>PBs 100L</b>	<b>PBs 1.000L</b>	<b>PBs 10.000L</b>
Melaza	0.3	US\$40	US\$395	US\$3,967	US\$35,585
Extracto de levadura	2.050	US\$69	US\$674	US\$6,769	US\$60,716
Sulfato de amonio	0.3	US\$0	US\$43	US\$553	US\$3,915
Fosfato de potasio monobásico	1.136	US\$4	US\$42	US\$427	US\$3,829
Sulfato de magnesio Heptahidratado	0.07	US\$0	US\$1	US\$4	US\$49
Cloruro de Calcio	0.1325	US\$2	US\$22	US\$220	US\$1,976
Agua	0.00074	US\$2	US\$23	US\$234	US\$2,340
Inóculo	1.8	US\$58	US\$567	US\$5.670	US\$55,944

**Fuente:** Propia del autor.

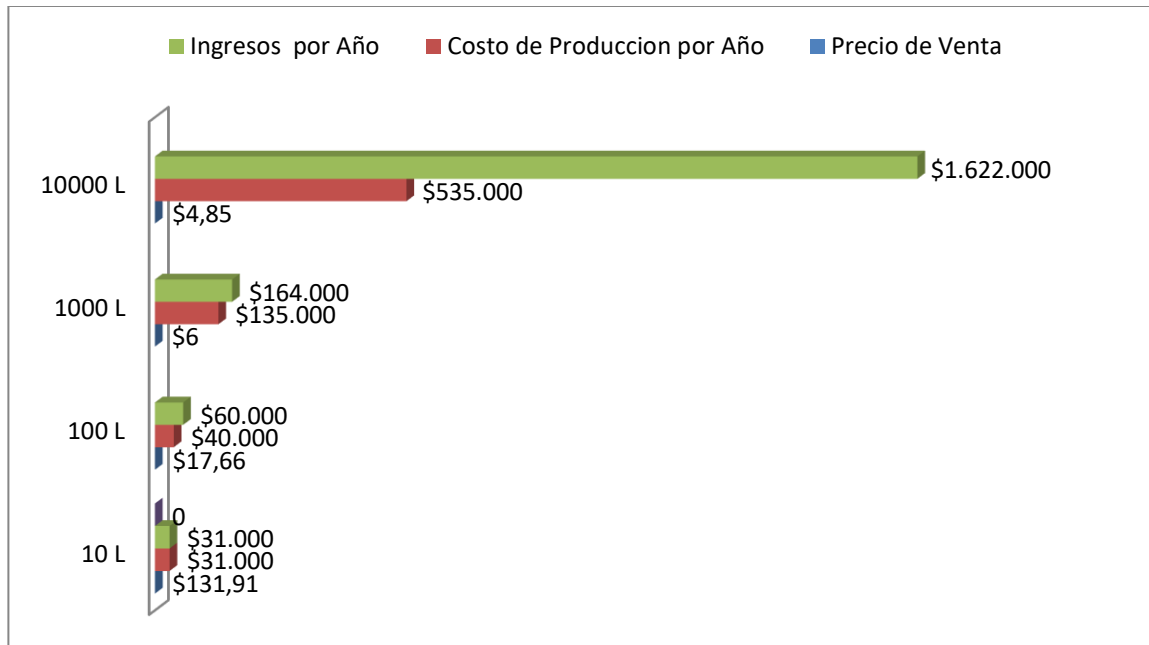
En la tabla 14, se presenta el resumen de la evaluación económica arrojada por *Superpro Designer*, donde se puede evidenciar el capital total de inversión, el costo operacional anual y otras variables primordiales para realizar un análisis de rentabilidad de forma rápida y así determinar su viabilidad.

El capital total de inversión incluye los costos fijos asociados al proceso de producción (ver tabla 15) como lo son la compra de equipos, instrumentación, edificaciones, plantas auxiliares (costos directos) y gastos de ingeniería-construcción (costos indirectos).

En la figura 18, se representa el análisis las variaciones que se presenta por escala en función de ingresos, costo de producción y precio de venta del inoculante. El costo operacional anual incluye materia prima, mano de obra, servicios básicos, consumibles y tratamiento de residuos entre otros (Ver tabla 16).

Los ingresos los establece la venta del inoculante (producto biotecnológico), pues no se ha considerado por el momento el aprovechamiento de la salida de la filtración (residuos del medio de producción). El precio de venta se determinó como la suma del costo de unidad de producción más la utilidad esperada, que en este caso osciló entre el 50 y el 70% (escalas 10,000L y 1.000L) por lo cual el precio varió entre US\$4.85 y US\$131.91 por kilogramo de biomasa, notándose que a mayor escala de producción es menor el precio de venta.

**Figura 18.** Análisis Ingresos - Costo de Producción- Precio de venta.



**Fuente:** Propia del autor.

El margen bruto nos da el porcentaje de los ingresos anuales que es de utilidad bruta. En las escalas de 10L y 100L se obtendría un porcentaje negativo, indicando que no podrá generar ganancia o ingreso que cubra el costo operacional anual. Por otro lado en la escala de 10.000L los ingresos lograrían una utilidad de US\$1,087,000.

La tasa de retorno se utiliza para valorar que tan conveniente es una inversión o proyecto, y se establece que si esta es mayor, más rentable será llevar a cabo el proyecto. En las escalas de 10L y 100L la tasa de retorno es inferior al 10%. Esto ocurre habitualmente en estas escalas derivando en que no sean rentables. Para el caso del bioreactor de 10,000L con una tasa de retorno del 58.59% ( Ver tabla 14 ) evidenciándose que es rentable, ya que los ingresos son más altos y los costos operacionales anuales son relativamente bajos, en comparación con las otras escalas.

El periodo de recuperación de la inversión es el tiempo requerido para que se recupere la inversión inicial de un proyecto, calculado a partir de los ingresos. El costo de operación anual para las tres primeras escalas es más alto que los ingresos por producción, lo que genera que no se logre tener un tiempo de reembolso del capital invertido. Para la última escala se contaría con 1,71 años de tiempo de reembolso, lo cual lo hace rentable.

La tasa interna de retorno (TIR) después de impuestos es la tasa de interés para la cual el valor presente neto (VAN) de un proyecto es cero. La TIR se representa en forma de porcentaje por período, y se expresa como un porcentaje positivo. Como se observa para los dos primeros casos no se tiene una TIR dentro del rango permitido, esto es debido a los altos costos de operación y los bajos rendimientos.

El valor actual neto es un indicador que mide los flujos de los futuros ingresos y egresos que tendrá un proyecto, para determinar, si luego de descontar la inversión inicial, nos quedaría alguna ganancia. En términos generales, un VAN positivo indica que es viable invertir en el proyecto, mientras que uno negativo significa lo contrario; éste se calcula para una baja tasa de interés, el valor por defecto es del 7%. En el Anexo 2 se presenta el Informe de Evaluación Económica, tal como lo arroja el software.

**Tabla 14.** Resumen Evaluación Económica de los procesos de producción simulados

	<b>PBs 10L</b>	<b>PBs 100L</b>	<b>PBs 1.000L</b>	<b>PBs 10.000L</b>
<b>Capital total de la inversión</b>	US US\$16,000	US US\$46.000	US\$317,000	US\$1.113.000
<b>Costo operacional anual</b>	US\$31,000 /año	US\$40,000 /año	US\$135,000 /año	US\$535.000 /año
<b>Ingresos</b>	US\$31,000 /año	US\$60,000 /año	US\$164,000 /año	US\$1.622.000 /año
<b>Producción base anual</b>	349.72 kg Biomasa/año	3,377 kg Biomasa/año	33,908 kg Biomasa/año	334,371 kg Biomasa/año
<b>Costo unitario de producción</b>	US\$87.94 / kg Biomasa	US\$11.77 / kg Biomasa	US\$4.00 /kg Biomasa	US\$1.60 /kg Biomasa
<b>Precio de venta</b>	US\$131.91/ kg Biomasa	US\$17.65 kg Biomasa/año	US\$6.00 /kg Biomasa	US\$4.85/kg Biomasa
<b>Margen bruto</b>	-0.23%	-0.01%	33.41%	67.04 %
<b>Tasa de retorno</b>	7.14%	8.46%	21.73%	58.59 %
<b>Periodo de recuperación de la inversión</b>	14.01 años	11.82 años	4.60 años	1.71 años
<b>TIR(después de impuestos)</b>	No aplica	No aplica	13.98%	79.92 %
<b>Valor presente Neto o(al 7,0% de interés)</b>	- US\$26,000	- US\$37,000	US\$153,000	US\$4,472,000

Fuente: Propia del autor.



Tabla 15. Resumen de la estimación costos fijos

	<b>PBs 10L</b>	<b>PBs 100L</b>	<b>PBs 1000L</b>	<b>PBs 10000L</b>
<b>Costo directo total-Planta</b>				
<b>Compra de equipos</b>	US\$4.000	US\$29.000	US\$211.000	US\$695.000
<b>Instalación</b>	US\$2.000	US\$3.000	US\$61.000	US\$219.000
<b>Redes de tubería</b>	--	--	US\$2.000	US\$7.000
<b>Instrumentación</b>	--	--	US\$2.000	US\$7.000
<b>Aislamiento</b>	--	--	US\$2.000	US\$7.000
<b>Redes eléctricas</b>	--	--	US\$2.000	US\$7.000
<b>Edificaciones</b>	--	US\$ 1.000	US\$2.000	US\$70.000
<b>Mejoras</b>	--	--	--	US\$7.000
<b>Plantas auxiliares</b>	--	--	US\$2.000	US\$7.000
<b>Costo indirecto total</b>				
<b>Ingeniería</b>	0	--	US\$3.000	US\$10.000
<b>Construcción</b>	US\$.6000	--	US\$3.000	US\$10.000
<b>Costo Total Planta</b>	<b>US\$12000</b>	<b>US\$35.000</b>	<b>US\$291.000</b>	<b>US\$1.046.000</b>
<b>Gastos adicionales</b>				
<b>Gastos contratistas</b>	--	US\$2.000	US\$3.000	US\$10.000
<b>Contingencia</b>	US\$ 1.000	US\$4.000	US\$3.000	US\$10.000
<b>Total</b>	<b>US\$13.000</b>	<b>US\$41.000</b>	<b>US\$29.600</b>	<b>US\$1.067.000</b>

Fuente: Propia del autor.

**Tabla 16.**Costos de operacional anual.

	<b>PBs 10L</b>	<b>PBs 100L</b>	<b>PBs 1000L</b>	<b>PBs 10000L</b>
<b>Mano de obra</b>	US\$27.680	US\$28.335	US\$28.503	US\$28.669
<b>Materias primas e insumos</b>	US\$214	US\$1.768	US\$17.844	US\$164.102
<b>Servicios básicos</b>	US\$3.000	US\$8.000	US\$69.000	US\$141.000
<b>Servicios auxiliares</b>	US\$53	US\$568	US\$5.771	US\$56.946
<b>Consumibles varios</b>	US\$58	US\$38	US\$385	US\$3.802
<b>Tratamiento de residuos</b>	US\$141	US\$1.520	US\$14.214	US\$139.807
<b>Total</b>	<b>US\$31.000</b>	<b>US\$40.000</b>	<b>US\$135.000</b>	<b>US\$535.000</b>

**Fuente:** Propia del autor.

En la tabla 17, se presentan los resultados del análisis ambiental, donde se incluye la producción de residuos líquidos, sólidos y emisiones atmosféricas. Se resalta, que para las cuatro escalas comparadas, hay una producción de residuos líquidos (o efluentes) asociada a la salida del proceso de microfiltración, aportando 9 L de residuo/kg Biomasa. En relación con las emisiones atmosféricas estas se estiman en 0,004 kg de CO<sub>2</sub>/kg de biomasa. Finalmente, el software no indica producción de residuos sólidos, debido a que en el proceso de clasificación de las corrientes, la salida del sistema de microfiltración se categorizo como producto principal y este sería el mayor aportante de residuos sólidos de la producción de inoculante, por esta razón la considera 0. En el Anexo 3 se presenta de forma detallada el Informe de Impacto Ambiental de cada una de las simulaciones.

Tabla 17. Generación de residuos según su tipo

<b>TIPO</b>	<b>Cantidad residuo/kg Biomasa</b>	<b>Cantidad residuo/Batch</b>	<b>Cantidad residuo/año</b>
<b>PBs 10 L</b>			
<b>Líquido</b>	9.00 L	10.319 L	3,147 L
<b>Sólido</b>	--	--	--
<b>Emisiones atmosféricas</b>	0.003 kg	0.004 kg	1 kg
<b>PBs 100 L</b>			
<b>Líquido</b>	9.00 L	101.301L	30,390L
<b>Sólido</b>	--	--	--
<b>Emisiones atmosféricas</b>	0.004 kg	0.042 kg	13 kg
<b>PBs 1000 L</b>			
<b>Líquido</b>	9.00 L	1,017.239 L	305,172 L
<b>Sólido</b>	--	--	--
<b>Emisiones atmosféricas</b>	0.004 kg	0.038 kg	11 kg
<b>PBs 10000L</b>			
<b>Líquido</b>	9.00 L	10,166.678 L	3,009,337 L
<b>Sólido</b>	--	--	--
<b>Emisiones atmosféricas</b>	0.004 kg	4.250 kg	1,258 kg

Fuente: Propias del autor.

## 5. PROTOTIPADO Y DISEÑO FINAL

La cepa de *Bacillus subtilis* empleada en el presente trabajo pertenece a la colección de microorganismos del Laboratorio de Biotecnología del Centro Agroempresarial y Minero -SENA Regional Bolívar, la cual fue aislada de aguas y suelos contaminados por la minería de oro en el Sur de Bolívar. Conservada a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml en agua estéril en mezcla con aceite mineral (crioprotector) a una temperatura de  $-19^{\circ}\text{C}$  y se espera realizar otros estudios para validar su potencial en otros procesos biotecnológicos.

### 5.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL


Este se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Agroempresarial y Minero SENA Regional Bolívar, desarrollándose en las siguientes fases.

#### 5.1.1 Fermentación

Las corridas de fermentación se realizaron en un fermentador BIOSTAT® A BB-882200 de Sartorius Stedim biotech, apropiado para el cultivo de microorganismos y células en procesos tipo batch. El equipo cuenta con sistema de medición, control y evaluación en línea de pH, temperatura y oxígeno. En el cuadro 12, se relaciona la ficha técnica del fermentador.

**Cuadro 12.**Características del fermentador

<p><b>Suministro de Energía</b></p> <p>Alimentación: 100-240 VAC, 50/60 Hz, Consumo de energía: 8 A Grado de protección: IP 20 Protección del aparato: 2 fusibles del aparato 5,2 + 20 mm, retardo, 250 V CA, 8 A/T (UL)</p>	
<p><b>Suministro de agua de refrigeración</b></p> <p>Tasa de alimentación: mín. 1 l/min Presión de alimentación: 0,6 bares Temperatura: mínimo = 6 °C Dureza máx. del agua: 12° dH Calidad del agua: agua limpia, libre de partículas Desagüe: sin presión</p>	
<p><b>Suministro de gas de proceso</b></p> <p>Presión de alimentación [bares g]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aire comprimido [AIR]: regulación previa 1,5 bares g</li> <li>• O<sub>2</sub>: regulación previa 1,5 bares g</li> <li>• N<sub>2</sub>: regulación previa 1,5 bares g</li> <li>• CO<sub>2</sub>: regulación previa 1,5 bares g</li> </ul> <p>Tasa máx. de alimentación:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aire comprimido: 7,5 l/min</li> <li>• O<sub>2</sub>: 7,5 l/min</li> <li>• N<sub>2</sub>: 0,5 l/min</li> <li>• CO<sub>2</sub>: 0,5 l/min</li> </ul> <p><i>Todos los gases: secos y libres de partículas</i></p>	

<b>Recipientes de cultivo</b>	
Volumen de trabajo: 4L	
Volumen total: 7L	
Material: vidrio	
<b>Temperatura</b>	
<p>Temperatura máxima de trabajo: 60°C (en el manguito calefactor hasta + 95)</p> <p>Temperaturas mínimas de trabajo (agua de refrigeración): 4°C.</p>	

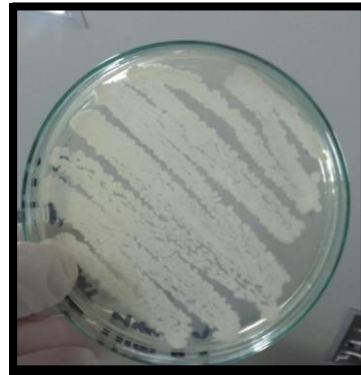
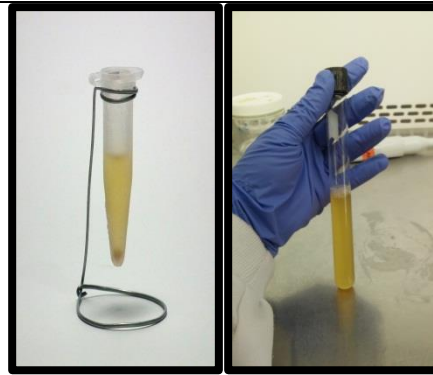
**Fuente:** Sartorius (2015)

En el cuadro 13, se presentan las actividades desarrolladas en las corridas experimentales de las fermentaciones, las cuales se hicieron por triplicado.

**Cuadro 13.** Actividades del desarrollo experimental de las fermentaciones

<p><b>Activación de la cepa</b></p> <p>La cepa se retiró de la crioconservación, se aclimató a temperatura ambiente por 30 min y luego fue incubada a 35+/-2°C durante 2 h.</p> <p>Después se realizó la siembra en caldo nutritivo y se incubó a 35+/-2°C durante 48 h.</p>	
--	--

Finalizado el procedimiento anterior se realizó siembra en agar nutritivo para evaluar viabilidad (recuento en placa) y pureza de la cepa (coloración de Gram y de esporas)



**Obtención preinóculo  
40 ml**

Del crecimiento anterior se realizó una suspensión celular en 10 ml de solución salina comparándose con el tubo 5 de la escala McFarland ( $15 \times 10^8$  UFC/ml) y a continuación se transfirió a 30 ml del medio de producción. El preinóculo se mantuvo a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  y agitación de 200 rpm durante 24 h.



**Obtención inóculo  
400 ml**

Al preinóculo se le realizó prueba de pureza (coloración de Gram y de esporas) y luego se transfirió a los 360 ml del medio de producción (adaptado de Giacaman) donde se mantuvo a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  y agitación de 200 rpm durante 24 h.




**Fermentación 4000ml**

El inóculo se transfirió a los 3600 ml del medio de producción. Se programó el fermentador a las siguientes condiciones:

- \* Oxígeno Disuelto: 2 mg/L
  - \* % Oxígeno: 25 %
  - \* pH: 7- 7,2
  - \* Temperatura: 37°C
  - \* Caudal de aire: 1 VVM
  - \* Volumen del inóculo: 10% V/V
- La agitación se evaluó en tres velocidades: 200-175-150 rpm.





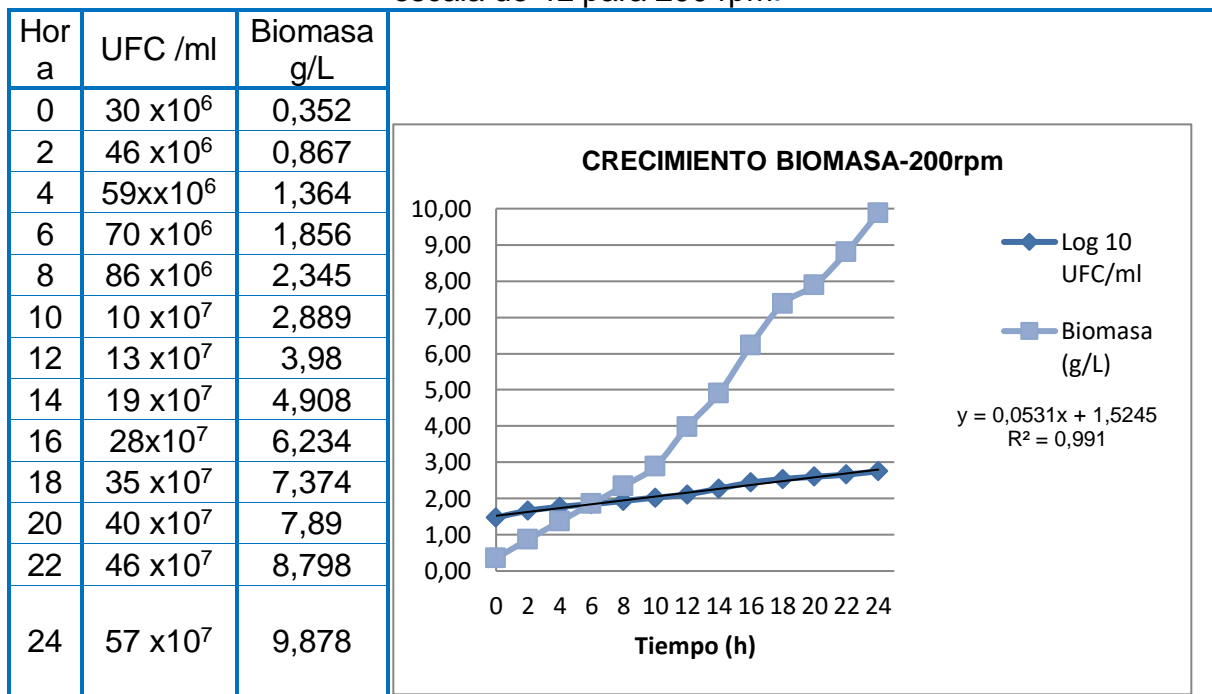
<p><b>Seguimiento</b></p> <p>Se realizaron muestreos, tomándose 50 ml cada uno del medio de producción cada 2 horas para evaluar la producción de biomasa (peso seco – recuento en placa) durante 24 horas (ver anexos 4 y 5)</p>	
---	--

**Fuente:** Propia del autor.

### 5.1.2 Resultados seguimiento y control de las fermentaciones

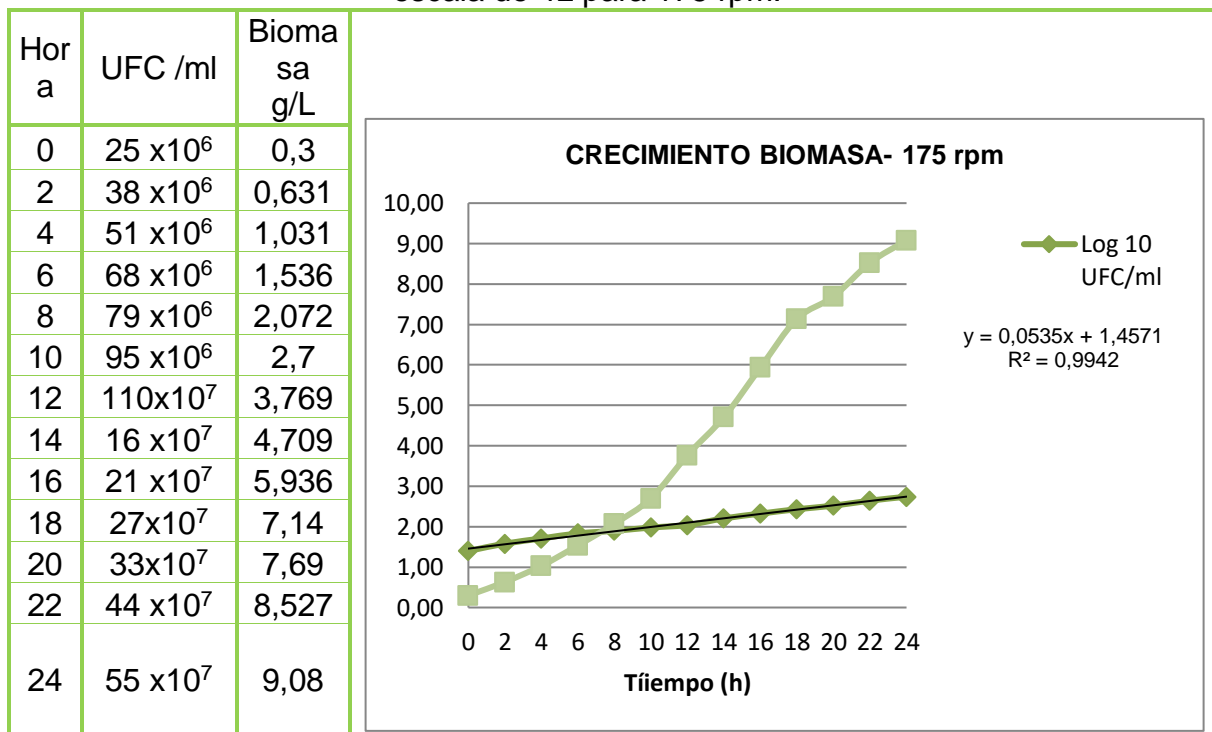
En las tablas 18,19 y 20 se registran los datos arrojados en las corridas experimentales en las diferentes velocidades evaluadas. En un estudio anterior realizado por el autor del proyecto, donde se determinó la cinética de *Bacillus subtilis* se llegó a identificar que a partir de la hora 26 comienza la fase estacionaria. Dado que el interés es llegar a la fase exponencial, pues es donde se presenta el mayor crecimiento microbiano, se decidió realizar el seguimiento cinético hasta las 24 horas. El medio de producción empleado para las corridas experimentales fue el adaptado por Giacaman (Ver tabla 8), el cual también empleado en las simulaciones pues este posee melaza de caña de azúcar y extracto de levadura que se han validado como fuente de carbono y nitrógeno adicionalmente son de bajo costo haciéndolo más atractivo para su aprovechamiento como medio alternativo.

**Tabla 18.**Resultados de las corridas experimentales de las fermentaciones a escala de 4L para 200 rpm.



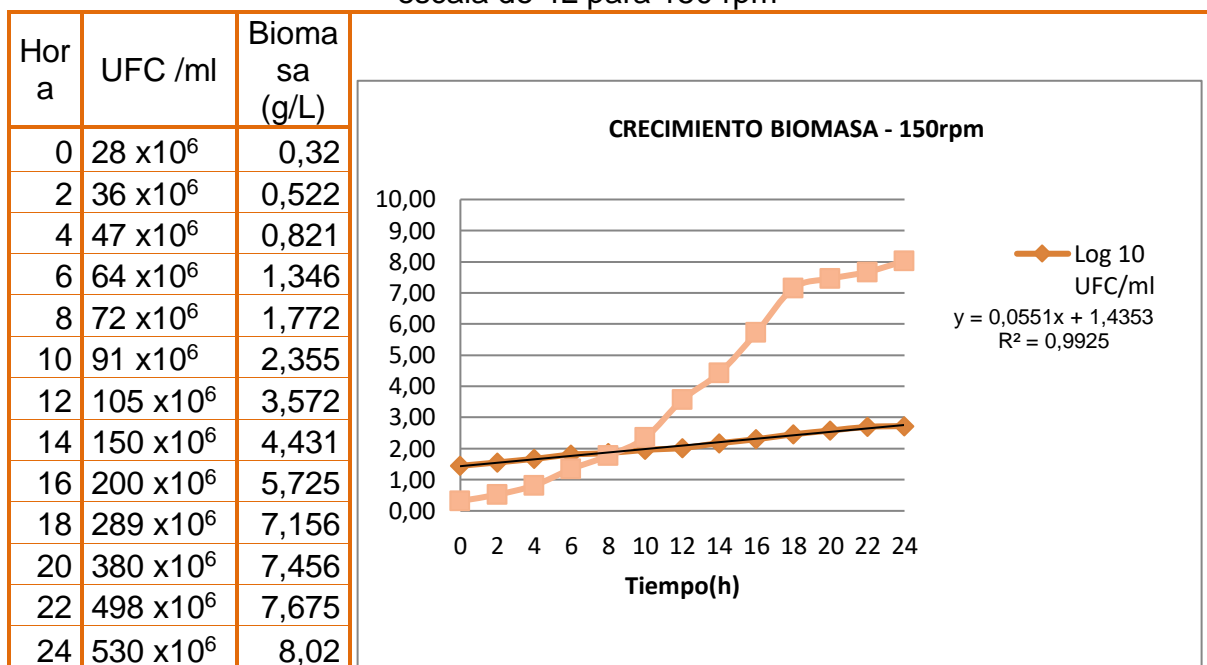
Fuente: Propia del autor.

**Tabla 19.**Resultados de las corridas experimentales de las fermentaciones a escala de 4L para 175 rpm.



Fuente: Propia del autor.

**Tabla 20.** Resultados de las corridas experimentales de las fermentaciones a escala de 4L para 150 rpm



Fuente: Propia del autor.

Se evidenció que la velocidad de agitación que reportó mayor rendimiento en la formación de biomasa fue la de 200 rpm con un reporte a las 24 horas de  $57 \times 10^7$  UFC/ml - 9,878 g de biomasa /L, seguido de la agitación a 175 rpm con un reporte de  $55 \times 10^7$  UFC/ml - 9,08g de biomasa/ml y finalmente la agitación a 150 rpm con una producción de  $530 \times 10^6$  UFC/ml – 8.02 g de biomasa/L. La agitación es una operación muy importante debido a que mantiene constantes las condiciones fisicoquímicas en el fermentador, suministrando oxígeno de forma eficaz a la bacteria, la cual es aerobia, promoviendo el incremento de células y por ende lográndose cultivos más concentrados.

## 5.2 BIOSEPARACIÓN SÓLIDO –LÍQUIDO

En la evaluación de los parámetros objetivos de la bioseparación (ver tabla 5), la microfiltración tangencial ocupó el primer lugar. Sin embargo, debido a que no se contaba con un sistema piloto en el Laboratorio de Biotecnología, en la fase

experimental se evaluó la segunda alternativa que fue la centrifugación tubular. En el cuadro 14, se relaciona la ficha técnica de la centrífuga 5702 rotor A-4-38 no refrigerada de Eppendorf® en la cual se realizaron las corridas de bioseparación. El desarrollo de la bioseparación se realizó con las corridas de las fermentaciones de 200 rpm

**Cuadro 14.** Actividades del desarrollo experimental de las fermentaciones.

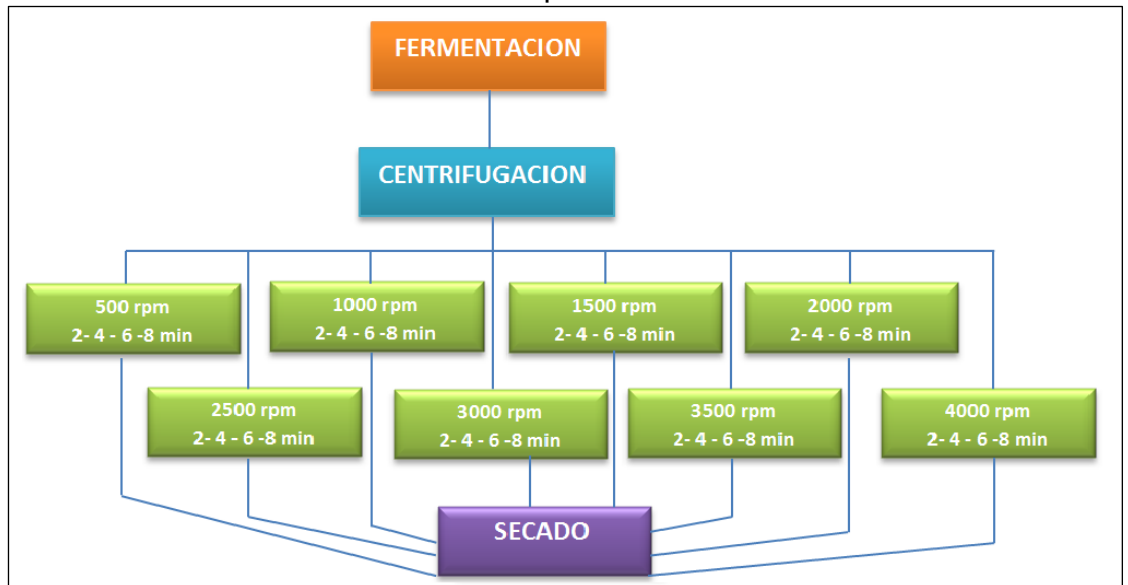
<b>Voltaje</b>	110 V	
<b>Potencia de salida</b>	200 W	
<b>Máxima velocidad</b>	4400 rpm	
<b>Aceleración centrífuga máx.</b>	3000 rcf	
<b>Carga máxima</b>	4x90 ml	
<b>Energía cinética máxima</b>	2280 N*m	
<b>Densidad máxima de centrifugación</b>	1,2 g /ml	
<b>Temperatura</b>	2-40°C	
<b>Humedad relativa máxima</b>	75%	
<b>Altura de posición</b>	Máx. 2000 smnm	
<b>Dimensiones</b>		
Altura	241 mm	
Ancho	320 mm	
Profundidad	395 mm	

Fuente: Eppendorf® (2011)

En la figura 19, se presentan las condiciones bajo las cuales se desarrollaron las corridas de bioseparación sólido-líquido, las cuales se realizaron por triplicado mediante centrifugaciones a velocidades de 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, y 4000 rpm, y para cuatro tiempos diferentes, de 2 , 4, 6 y 8 minutos. Para

cada centrifugación se emplearon tubos de 50 ml con un volumen del 20 ml , se descartó el sobrenadante y el sólido separado que quedo en el tubo, se secó en el horno durante 4 horas a una temperatura de 80 °C.

**Figura 19.** Condiciones de las corridas experimentales de Bioseparación sólido-líquido.

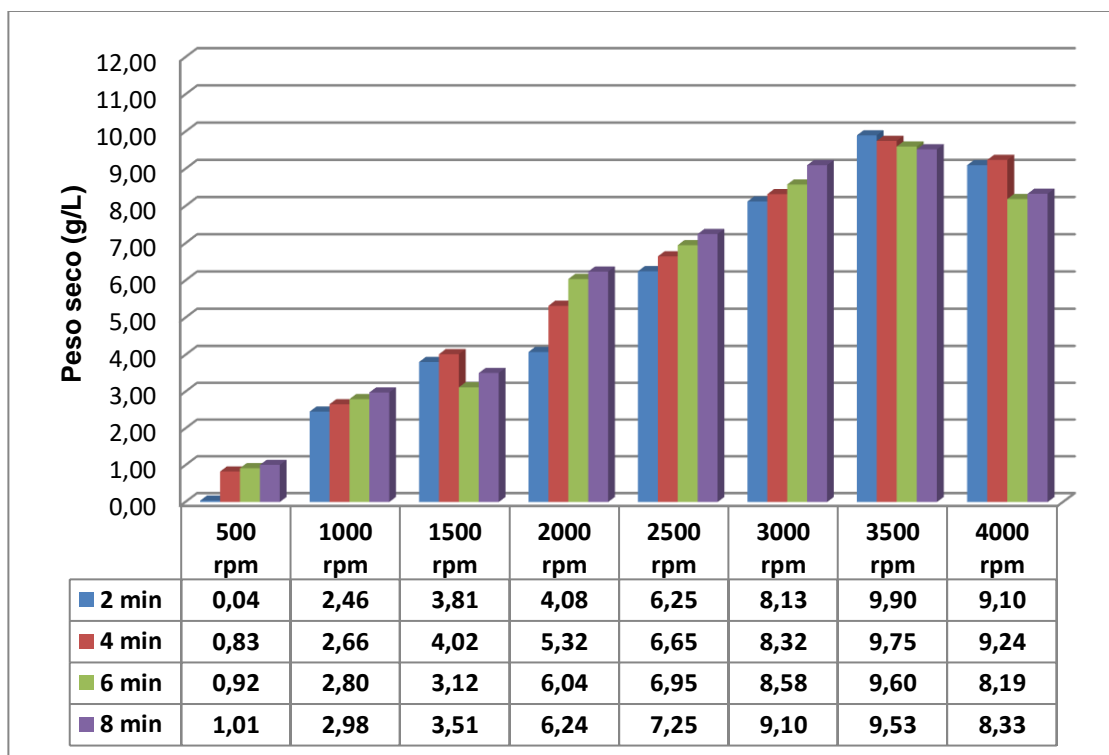


**Fuente:** Propia del autor.

### 5.2.1 Resultados bioseparación sólido líquido

En la figura 20, se presentan los resultados del proceso de secado de la biomasa después de los ensayos de centrifugación a diferentes velocidades y tiempos, donde se logró evidenciar que a una velocidad de 3500 rpm por 2 minutos se separó la mayor cantidad biomasa (9,90 g/L). La menor cantidad de biomasa obtenida fue de 0,04 g/L para una velocidad de 500 rpm por 2 minutos. A partir de los 2500 rpm se presenta una tendencia de aumento progresivo de la cantidad de biomasa separada hasta los 3500 rpm, observando que a los 4000 rpm se presenta un descenso que puede ser dado por la lisis celular debida a la fuerza centrífuga generada en el proceso. Se evidencia también que hasta velocidades de 3000 rpm, la cantidad de biomasa seca obtenida aumenta al aumentar el tiempo de centrifugado, mientras que a partir de 3500 rpm el efecto es inverso.

**Figura 20.** Tiempo de centrifugación (rpm) vs Peso seco (g/L).



Fuente: Propia del autor.

### 5.3 PROTOTIPADO

Para definir la presentación del inoculante se determinaron, de acuerdo con la bibliografía, cuatro formulaciones, las cuales se detallan en el cuadro 15.

**Cuadro 15.**Actividades del desarrollo experimental de las fermentaciones.



PROTOTIPO	ESTADO	COMPOSICION	FUENTE
CAOLIN	SOLIDO	Caolín .....1000 g Carbonato de calcio .....15 g Carboximetilcelulosa ..... 10 g Suspensión de <i>Bacillus subtilis</i> ..... 400 ml	(Vidhyasekaran.P & Muthamilan, 1995)

HARINA	SOLIDO	Harina de trigo .....750 g Dextrosa.....200 g Caolín.....50 g Aceite mineral.....200 ml Suspensión de <i>Bacillus subtilis</i> ..... 400 ml	(Valencia & Valencia, 2008)
EMULSION	LIQUIDO	Tween 20.....4.8 ml Aceite vegetal.....120 ml Agua destilada.....280 ml Suspensión de <i>Bacillus subtilis</i> ..... 15 ml	(Acevedo, Buitrago, Villegas, & Ceron, 2009)
SUSPENSION	LIQUIDO	Agua destilada..... 360 ml Suspensión de <i>Bacillus subtilis</i> .....40 ml	(Labandera & Mayans, 2006)

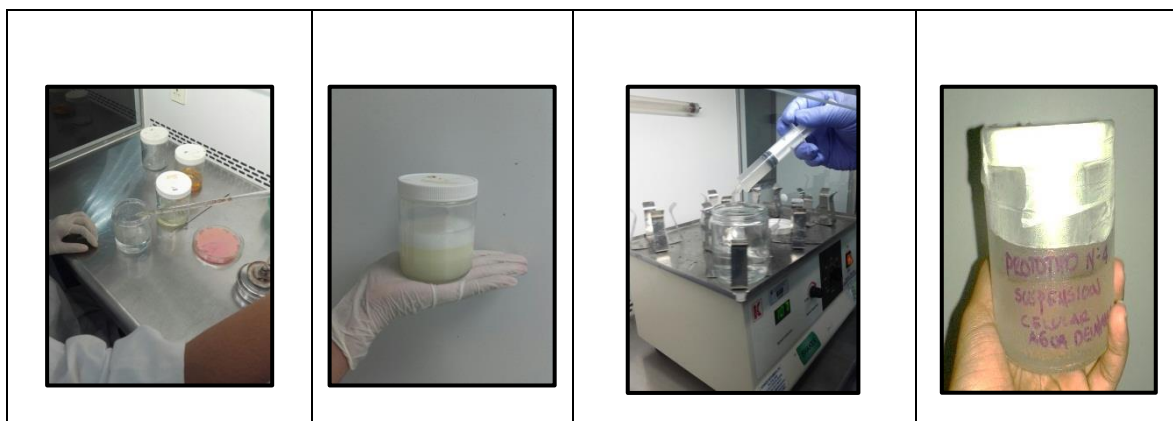
**Fuente:** Propia del autor.

En el cuadro 16, se presenta la elaboración de los prototipos de acuerdo a las recomendaciones hechas por los autores citados anteriormente, dentro de las cuales, las principales fueron la calidad microbiológica de la suspensión celular (pureza – concentración bacteriana mínima  $2.4 \times 10^9$  UFC/ml), asepsia y la mezcla respetando las cantidades establecidas.

**Cuadro 16.**Elaboración de Prototipos.

<b>Prototipo Caolín</b>			
<p>Por cada 160ml de suspensión bacterial se utilizaron 200 g de caolín, 3 g de carbonato de calcio y 2g de CMC. El caolín y el carbonato fueron previamente mezclados y esterilizados a 121 °C a 15 psi por 1 hora y el CMC fue esterilizado de igual forma pero en recipiente separado. Después se mezclaron todos estos en condiciones estériles con los 80 ml suspensión celular y finalizado este procedimiento se extiende en una bandeja y se secó a una temperatura de 40°C durante 2 días. Una vez seca se adicionó el CMC .</p>			
			
<b>Prototipo Harina</b>			
<p>Por cada 160 ml de suspensión bacterial se utilizaron 200 g de harina de trigo, 53 g de dextrosa, 13 g de caolín mineral y 107 ml de aceite vegetal. La harina, la dextrosa y el caolín fueron mezclados previamente y esterilizados en un recipiente independiente del aceite vegetal. En condiciones estériles, se fueron mezclando los 80 ml de la suspensión bacteriana, el aceite y la mezcla de harina. La masa formada fue extendida en una bandeja y se secó a una temperatura de 40°C durante 2 días.</p>			
			
<b>Prototipo Emulsión</b>		<b>Prototipo Suspensión</b>	
<p>Se mezclaron 140 ml de agua destilada estéril con 60 ml de aceite vegetal y 2.4 ml de Tween 20, agitándose a 750 rpm por 10 minutos, obteniéndose la emulsión, luego se le adiciona los 15 ml de suspensión bacteriana y nuevamente es mezclada por inmersión durante 1 min.</p>		<p>Se toma el cultivo celular con una concentración de <math>2.4 \times 10^9</math> (tubo 8 - Escala McFarland), se centrifuga 40 ml a 3500 rpm por 2 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue suspendido en los 160 ml agua destilada estéril y es mezclada a 200 rpm por 3 min.</p>	





Fuente: Propia del autor

En el cuadro 17, se presenta una breve descripción de la presentación final de los prototipos desarrollados

**Cuadro 17.** Descripción final prototipos.


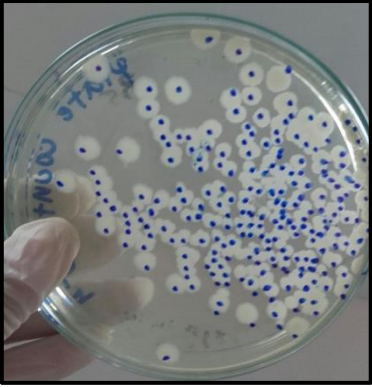
PROTOTIPO	CANTIDAD	APARIENCIA	CONDICION DE ALMACENAMIENTO
<b>CAOLIN</b>	280 g	Sólida - Polvo	Lugar seco, fresco y ventilado No exponerlo a la luz del sol directa ni a temperaturas mayores de 40°C.
<b>HARINA</b>	390 g	Sólida granular -	Lugar seco, fresco y ventilado No exponerlo a la luz del sol directa ni a temperaturas mayores de 40°C.
<b>EMULSION</b>	217 ml	Líquida-aceitosa	Lugar seco, fresco y ventilado No exponerlo a la luz del sol directa ni a temperaturas mayores de 40°C.
<b>SUSPENSION</b>	200 ml	Líquida	Lugar seco, fresco y ventilado No exponerlo a la luz del sol directa ni a temperaturas mayores de 40°C.

Fuente: Propia del autor.

#### 5.4 CONTROL DE CALIDAD DEL PROTOTIPOS.

Los prototipos se almacenaron a temperatura ambiente y a las 2 semanas se realizaron pruebas de pureza (tinción de Gram), viabilidad (diluciones seriadas) microbiana tomando un gramo o mililitro de cada prototipo (Tabla 21). Se evidenció que el prototipo de Caolín presento la mayor conservación, con el 97.61% respecto a la concentración inicial, seguido de la emulsión, con un 95,24%. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

**Tabla 21.**Control de calidad prototipo

Pureza- prototipo caolín		Viabilidad - prototipo caolín	
			
Prototipo	Recuentos (UFC/ml o UFC/g)		% CONSERVACION
	T=0	T= SEMANA 2	
<b>Caolín</b>	42x10 <sup>7</sup> UFC/g	41x10 <sup>7</sup> UFC/g	97,61%
<b>Harina</b>	20x10 <sup>7</sup> UFC/g	18 x10 <sup>7</sup> UFC/g	90 %
<b>Emulsión</b>	21x10 <sup>7</sup> UFC/ml	20x10 <sup>7</sup> UFC/ml	95,24%
<b>Suspensión</b>	24x10 <sup>7</sup> UFC/ml	20x10 <sup>7</sup> UFC/ml	83,33%

Fuente: Propia del autor.

Para los ensayos de biodegradación se seleccionó el prototipo de caolín por presentar el mayor porcentaje de conservación de células viables y los mayores recuentos. Para determinar la dosis de aplicación según las condiciones citadas en la tabla 22, estas fueron seleccionadas de acuerdo a la curva de biodegradación realizada al microorganismo en el Laboratorio de Biotecnología en un estudio previo, realizado por el autor del proyecto donde se logró identificar el pH y concentración óptima de degradación por parte de *Bacillus subtilis* y los parámetros fueron fijados por revisión bibliográfica

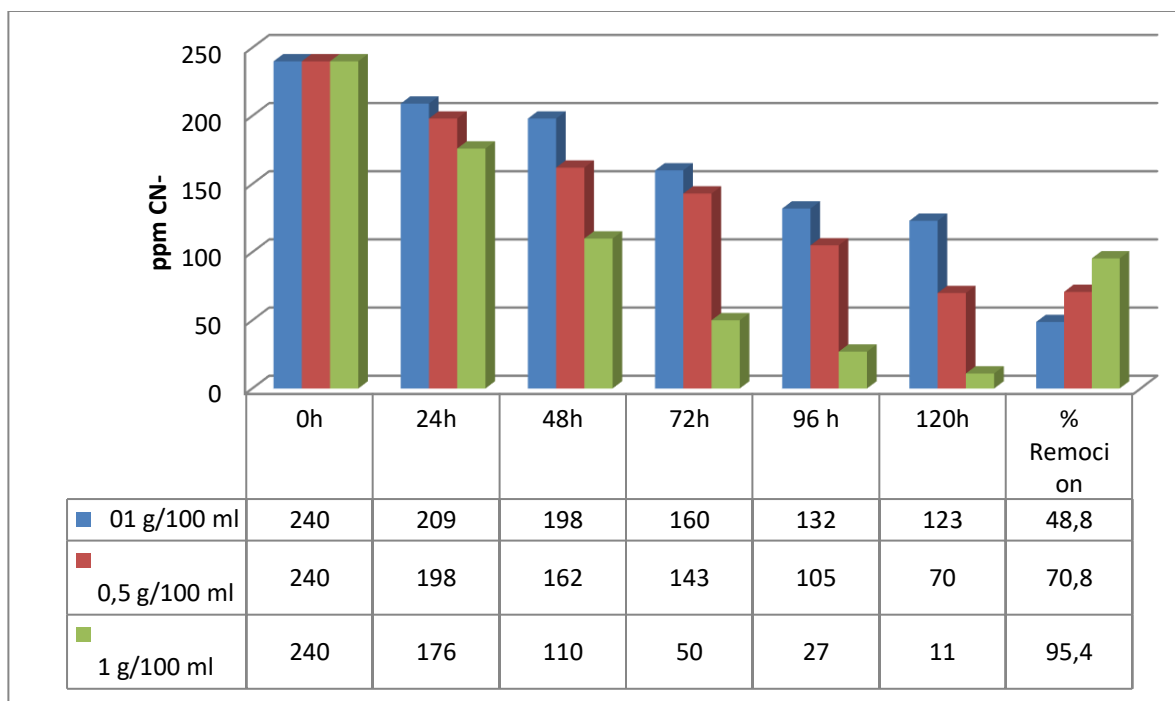
**Tabla 22.** Condiciones de evaluación de dosis de aplicación.

Dosis	Medio M63	pH ( Propia del autor)	°T (°C) (Ozel,2010)	Agitación (rpm) (Ozel,2010)	Cianuro (ppm) ( Propia del autor)	Tiempo (horas) (Ozel,2010)
1. 0,1 g /100ml	Por cada litro:	10.5	32°C	120 rpm	240	120 h
2. 0,5 g/100ml	Fosfato de Potasio.....13,6g					
3. 1 g /100 ml	Sulfato de amonio.....2g Sulfato de Hierro .....0,5 mg Sulfato de magnesio 0,24 g Glucosa .....0,4 g					

Fuente: Propia del autor.

En la figura 21, se presenta la evaluación de la dosis de producto en función de la remoción de cianuro en el tiempo, identificándose que la dosis óptima de aplicación es 1g/100 ml con un porcentaje de remoción del cianuro del 95,4 lográndose a las 120 horas de aplicación. La determinación del cianuro se realizó por colorimetría (ver anexo 6).

**Figura 21. Evaluación de dosis de aplicación**



Fuente: Propia del autor

## 5.5 ESPECIFICACIONES TECNICAS DEL PROCESO

Después de la fase de experimentación se establecieron las especificaciones de cada una de las etapas del proceso de producción del inoculante, la cual inicia con la obtención del inóculo, pasando por una serie de alistamientos para llegar al proceso principal, la fermentación, donde se obtiene la biomasa en los rendimientos estandarizados. Finalmente en la etapa de separación mediante la microfiltración se logró una mayor concentración de la biomasa para su posterior empaque y almacenamiento (Ver cuadro 18).

**Cuadro 18.** Especificaciones técnicas del proceso de producción del inoculante.

Etapa	Especificaciones
<b>Obtención del Inoculo</b>	El inoculo se obtuvo a partir de cultivos jóvenes (48h máx.), asegurando de esta manera una respuesta rápida de crecimiento y pureza. Este material microbiológico constituye el punto de partida para el escalado. La concentración del cultivo iniciador debe estar acorde al tubo 5 de la escala McFarland ( $15 \times 10^8$ ). El medio de cultivo es el mismo que el de producción para acortar la fase de adaptación del microorganismo. El volumen a producir debe ser el 10% del volumen de trabajo del fermentador.
<b>Preparación del medio de producción</b>	El medio de producción debe prepararse respetando las cantidades establecidas en la formulación (ver tabla 6) y en especial las fuentes de nitrógeno (extracto de levadura y sulfato de amonio) debido a que son favorables para el crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> . El medio debe ser esterilizado empleando intercambiadores por los cuales circule vapor de agua a una temperatura de 156°C durante 30 min y después se estabiliza a una temperatura de 37°C, seguido se ajusta el pH a 7+/- 0,2.
<b>Inoculación</b>	Se trasfiere al fermentador el inoculo, después de verificar su pureza y su viabilidad, verificándose que corresponda al 10% del volumen de trabajo de la fermentación.
<b>Fermentación</b>	<p>Su operación es de tipo batch y manteniendo a través del control automático las siguientes condiciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Oxígeno Disuelto: 2 mg/L</li> <li>* % Oxígeno: 25 %</li> <li>* pH: 7 +/- 0,2</li> <li>* Temperatura: 37°C</li> <li>* Caudal de aire: 1 VVM</li> <li>* Agitación: 200 rpm.</li> <li>* Tiempo: 24 horas.</li> <li>* Monitorización constante.</li> </ul> <p>El muestreo se realiza cada seis (6) horas verificando pureza y concentración microbiana.</p> <p>Finalizado el proceso se deja sedimentar por una hora el medio de producción con el fin de concentrar la biomasa en la base del fermentador para su posterior separación.</p>

<b>Microfiltración</b>	<p>El proceso de bioseparación sólido-líquido de la salida del fermentador se realiza con flujo tangencial y presurizado por medio de una membrana de polisulfona con un tamaño de poro de 0,45µm y las siguientes condiciones:</p> <p>Denaturación:5%  Tiempo de filtración: 4 – 12h dependiendo de la escala.  Factor de concentración:20  Recuperación: 95%  Temperatura de salida : 35+/-2</p>
<b>Mezclado – Secado</b>	<p>La formulación del producto (caolín) seleccionada debe estar en las cantidades establecidas (ver cuadro 16) y estériles antes de realizar el proceso en la tolva de mezclado vertical con un sistema de doble tornillo el cual se logra en 8-10 minutos.</p>
<b>Empaque y almacenamiento</b>	<p>El producto se dosifica a través de un tubo. Una vez empacado, se cierra en su parte superior. Se almacena en un lugar seco, fresco y ventilado.</p>

Fuente: Propia del autor

## 5.6 ESPECIFICACIONES TECNICAS DEL PRODUCTO

En el cuadro 19, se presentan las especificaciones técnicas del producto que son el resultado del proceso de control y seguimiento de la fermentación del inoculante bacteriano.

**Cuadro 19.**Especificaciones técnicas del producto

<b>Nombre del Producto</b>	BIO- CN Degradador de Cianuro
<b>Contenido microbiano</b>	<i>Bacillus subtilis</i> 57 x 10 <sup>7</sup> UFC/g
<b>Características microbiológicas</b>	Bacteria Gram positiva, de forma bacilar. Sus esporas pueden sobrevivir la calefacción extrema. Forma colonias de color crema opacas y rugosas.
<b>Ingredientes inertes</b>	Caolín .....1000 g Carbonato de calcio .....15 g Carboximetilcelulosa .....10 g

<b>Dosis de aplicación</b>	10 g del BIO-CN/ Litro
<b>Medidas de Protección</b>	Se recomienda usar guantes, tapabocas, gafas de seguridad y lavarse bien las manos después de aplicar. En caso de presentarse alguna alergia cutánea, respiratoria o ingestión accidental, consulte a su médico y muéstrele la etiqueta.
<b>Condiciones de almacenamiento</b>	Mantener en un lugar seco, fresco y ventilado No exponerlo a la luz del sol directa ni a temperaturas mayores de 40°C.
<b>Presentación y empaque</b>	Olor : Mineral Textura: Polvo Color: Beige Presentación: bolsa por 1Kg
<b>Toxicidad</b>	No es patógeno para animales, plantas y humanos; sin embargo, puede contaminar los alimentos, pero raramente causa intoxicación alimenticia.

**Fuente:** Propia del autor.

## CONCLUSIONES

El presente trabajo permite concluir que el diseño de un producto biotecnológico (inoculante microbiano) se puede realizar a través de la Biomecatrónica con el apoyo CAD (diseño asistido por computadora) como lo es el software *SuperPro Designer*, permitiendo realizar una evaluación sistemática de los requerimientos del proceso de producción para cada etapa del proceso de diseño.

La metodología permitió seleccionar el fermentador tipo tanque agitado y la microfiltración (bioseparación sólido- líquido) como los procesos óptimos para la producción de inoculante microbiano.

El informe de materiales y corrientes identificó que las tres primeras materias primas de acuerdo al consumo másico fueron el agua, la melaza y el extracto de levadura en orden decreciente, en relación con los costos, se identificó que las tres materias primas correspondientes al extracto de levadura (36,32%), el inóculo (31,32%) y la melaza (21,92%) equivalen al 88,73% de los costos de la materia prima.

La evaluación económica determinó que a partir de un volumen de producción de 10,000 litros el proceso es rentable con un costo de venta mínimo del inoculante de US\$4,85 por cada kilogramo, con un margen bruto del 67.04%, tasa de retorno del 58,59% y con un periodo de recuperación de la inversión de 1,71 años.

El informe de impacto ambiental reporta que hay mayor producción de residuos líquidos en la salida de la microfiltración aportando 9 L de residuo /kg Biomasa, seguido de emisiones atmosféricas con 0.004 kg de CO<sub>2</sub>/kg de biomasa y cero (0) producción de residuos sólidos.



En el desarrollo experimental de las fermentaciones a escala de laboratorio se logró identificar que la velocidad de agitación que reportó mayor rendimiento en formación de biomasa fue 200 rpm con un reporte a las 24 horas de  $57 \times 10^7$  UFC/ml – 9.878 g de biomasa /L.

La evaluación de la centrifugación como alternativa de bioseparación sólido líquido, arrojó que las condiciones óptimas fueron 3500 rpm durante 2 minutos.

En la fase de control de calidad de los prototipos se determinó que la formulación de caolín presentó la mayor conservación de la bacteria con un 97.61% respecto a la inicial seguido de la emulsión con un 95,24%.

Se estableció que la dosis óptima del inoculante es 1g/100 ml con un porcentaje de remoción del cianuro del 95,4% lográndose a las 120 horas de aplicación.

Para determinar la fiabilidad de la simulación vs experimentación se debe desarrollar la fase de bioseparación por microfiltración a escala laboratorio para realizar un análisis más preciso de estos.

## BIBLIOGRAFÍA

- INLAC. (4 de Junio de 2011). *INLAC*. Recuperado el 13 de Octubre de 2013, de [http://www.inlac.org/Doc/Doc\\_ISO-TS-176\\_04\\_11/Auditando\\_el\\_proceso\\_de\\_diseno\\_y\\_desarrollo\\_rev.pdf](http://www.inlac.org/Doc/Doc_ISO-TS-176_04_11/Auditando_el_proceso_de_diseno_y_desarrollo_rev.pdf)
- Acevedo, D., Buitrago, L. F., Villegas, V., & Ceron, J. M. (2009). *Evaluacion del contenido ruminal como suplemento alimenticio para el consumo de ganado Bovino Ensiladolo con Lactobacillus casei*. Medellin: Universidad EAFIT.
- Bitran, E., Benavente, J., & Maggi, C. (2011). *Bases de una estrategia de innovacion y competitividad para Colombia*. Bogota: Centro de Productividad Universidad Adolfo Ibañez.
- Branco, R. F., Santos, J. C., Murakami, L. Y., Mussatto, S. I., Dragone, G., Silva, ..., y otros. (2007). Xylitol production in a bubble column bioreactor: Influence of the aeration rate and immobilized. *Process Biochemistry*, 258–262.
- Cabieses, B., & Espinoza, M. (2011). La investigacion traslacional y su aporte para la toma de decisiones en politicas de Salud. *Peru Med Salud Publica*, 288-297.
- Centro de Investigacion en Biotecnologia Aplicada IPN. (2010). *La Biotecnologia en Mexico*. San Miguel de Allende: Instituto Politecnico Nacional.
- Chen, P. S., Tian, Q., Lin, M., Huang, H., & Li, S. (2013). Two-stage oxygen supply strategy for enhanced lipase production by *Bacillus subtilis* based on metabolic flux analysis. *Biochemical Engineering Journal*, 1-10.

- Chiang, C.-C., & Chiang, B.-H. (2013). Processing characteristics of submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea* in airlift bioreactor. *Biochemical Engineering*, 65-71.
- Corporación Andina de Fomento. (2005). *Biotecnología para el uso sostenible de la Biodiversidad. Capacidad locales y mercados potenciales*. Caracas: Unidad de Publicaciones de la CAF .
- Cotes, A., Cruz, C., González, C., Borrero, F., & Rodríguez, F. (2012). Antecedentes del programa de Nacional de Agroprospección. En M. Cotes, L. Barero, F. Rodríguez, M. A. Zuluaga, & Hector, *Bioprospección para el desarrollo del Sector Agropecuario de Colombia* (págs. 32-50). Bogotá: Produmedios.
- Cruz, C., Barrero, L., Rodríguez, Fernando, A. E., & Mestra, L. (2012). ANÁLISIS DE PROCESOS DE BIOPROSPECCIÓN EN COLOMBIA. En A. Cotes, L. S. Barrero, F. Rodríguez, M. V. Zuluaga, & H. Arévalo, *BIOPROSPECCIÓN PARA EL DESARROLLO DEL SECTOR AGROPECUARIO DE COLOMBIA* (págs. 21-31). Bogotá: Produmedios.
- DGE Consulting. (2013). *Estudio de oportunidades de inversión del sector de la biotecnología en Chile*. Santiago de Chile: Docencia Gestión Empresarial Investigaciones Económicas y Financieras.
- Dilsen, S., Herforth, A., Sandgathe, A., Althenbatch-Rehm, J., Freudl, R., Wandrey, C., y otros. (2001). Evaluation of parallel operated small-scale bubble columns for microbial process development using *Staphylococcus carnosus*. *Biotechnology*, 77-84.
- Ferreira Albania, S. M., Ribeiro da Silva, M., Fratelli, F., Cardoso Junior, C. P., Iourtovc, D., de Oliveira Cintra, F., y otros. (2015). Polysaccharide purification

from Haemophilus influenzae type b through tangential microfiltration. *Carbohydrate Polymers*, 67-73.

Fraser, J., & Kerboul, G. (2012). A holistic approach to pharmaceutical manufacturing: Product lifecycle management support for high yield processes to make safe and effective drugs. *Pharmaceutical Engineering*, 1-5.

Garay, L., Cabrera, M., Espitia, J., Fierro, J., Negrete, R., Rudas, G., y otros. (2013). Implicaciones ambientales y sociales del Modelo Extractivista de Colombia. En J. Viana, O. Alarcon, & R. Medina (Edits.), *Mineria en Colombia. Fundamentos para superar el Modelo Extractivista* (págs. 89-119). Bogota: Contraloria General de la Republica de Colombia.

Garcia, H. (2011). Impacto ambiental generado por la explotación de oro en el minería a cielo abierto. *Formando Investigadores*, 1(1), 120-133.

Garcia, O., Vallejo, V., & Claudia, M. (2015). La calidad desde el diseño: principios y oportunidades para la industria farmacéutica. *Estudios Gerenciales*, 68-78.

Gerardo, M., Zanain, M., & Lovitt, R. (2015). Pilot-scale cross-flow microfiltration of Chlorella minutissima: Atheoretical assessment of the operational parameters on energy consumption. *Chemical Engineering Journal*, 505-513.

Giacaman, A. (2006). *Formulacion de un biopesticididad para combatir la pudrición humeda en Cala (Zantedeschia spp) producida por Erwinia carotovora*. Valdivia: Universidad Austral de Chile.

Gomez, A. C. (2010). *Elaboracion de un modelo de Ingenieria Concurrente para el diseño de productos en condiciones de incertidumbre*. Medellin.

- Grech, P. (2001). Capitulo 3. El proceso de diseño en ingeniería. En P. Grech Mayor, *Introduccion a la Ingenieria: Un enfoque a través del Diseño* (págs. 70-90). Colombia: Pearson.
- Guevara, E. (2004). *Diseño, construcción y caracterización hidrodinámica de un bioreactor multifuncional*. Huajuaoan de León.
- Gutiérrez, F. (2014). *Estrategia de Política de Estado en Biotecnología y Bioseguridad Agropecuaria y el Plan de Acción*. San Jose de Costa Rica: Masterlitho S.A.
- Huang, T.-K., Wang, P.-M., & Wu, W.-T. (2001). Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an airlift reactor with wire mesh draft tubes. *Biochemical Engineering*, 35-39.
- ICH. (2009). *Guidance for Industry. Q8 (R2) Pharmaceutical Development*. ICH.
- Khondeea, N., Tathonga, S., Pinyakongb, O., Müllerc, R., t Soonglerdsongphae, S., i Ruangchainikome, C., y otros. (2015). Lipopeptide biosurfactant production by chitosan-immobilized *Bacillus* sp. GY19 and their recovery by foam fractionation. *Biochemical Engineering*, 47-54.
- Kunamneni, A., Taadimalla, Prabhakar, Jyothi, B., & Ellaiah, P. (2007). Investigation of continuous cyclodextrin glucanotransferase production by the alginate-immobilized cells of alkalophilic *Bacillus* sp. in an airlift reactor . *Enzyme and Microbial Technology*, 1538-1542.
- Labandera, C., & Mayans, M. (2006). *Curso Internacional de Producción de Biofertilizante desde el Laboratorio hasta la aplicación en Campo*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

- Liu, J., Ca, Y., Liao, X., Huang, Qingguo, Hao, Z., y otros. (2013). Efficiency of laccase production in a 65-L air-lift reactor for potential greenindustrial and environmental application. *Cleaner Production*, 154-160.
- Londoño, V. (6 de Mayo de 2013). Colombia no está preparada para la locomotora minera'. *El Espectador*, pág. 1.
- Lune-Finkler, C. L., & Finkler, L. (2008). Production of concentrates of bacterial bio-insecticide *Bacillus thuriangiensis* var. *israelensis* by flocculation/sedimentation. *Acta Tropica*, 134-138.
- Mandenius, C.-F. (2012). Biomechatronics for designing bioprocess monitoring and control systems: Application to stem cell production. *Journal of Biotechnology*, 430-440.
- Mandenius, C.-F., & Björkman, M. (2010). Mechatronics design principles for biotechnology product development. *Trend in Biotechnology*, 230-236.
- Martin, E. (2014). *El Sector biotecnológico español ¿un diamante por pulir?* Madrid: Kinrel.
- Oficina Economica y Comercial Embajada de España. (2012). *El mercado de la biotecnología en EE.UU.* Chicago: Instituto Español de Comercio Exterior.
- Peña, C. (27 de Febrero de 2013). Minería ha destruido 35.000 hectáreas de selva en el bajo Cauca. *Mundo Minero*, pág. 1.
- Potumarthi, R., Ch, S., & Jetty, A. (2007). Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis*

NCIM-2042:Effect of aeration and agitation regimes. *Biochemical Engineering*, 185-192.

Quijano Samper, P., & Pardo, M. (2010). *Elementos Diagnosticos para Caracterizacion de la Minería en Colombia*. Bogotá: Gestion Ambiental Estrategica.

Quintana, C., & Benavides, C. (2004). Sistema Nacionales de Innovacion Biotecnologica una Comparacion Internacional. *Revista Austriana de Economia* , 87-114.

Raigorodsky, G., Torres, M., & Diaz, M. (2002). Estrategia Metodológica para las etapas de investigación y desarrollo de un producto. *Cubana Farm*, 3(36), 207-210.

Ramirez, J. G. (2011). *Produccion y evaluacion de Bacillus subtilis y Trichiderma harzianum para el control de la sarna de la papa "Streptomyces spp"*. Sinaloa: Instituto Politecnico Nacional .

Rangarajan, V., Dhanarajan, G., & Sen, R. (2015). Bioprocess design for selective enhancement of fengycin production by a marine isolate Bacillus megaterium. *Engineering Journal*, 147-155.

Rocha, H., Cuadro, J., & Mora, C. (2013). Aplicación de la calidad basada en el diseño (QbD) en la reformulación de tabletas masticables. *Revista Colombiana de Ciencias Quimico Farmaceuticas*, 190-214.

Rosas, J. (2012). Implementacion de la tecnologia analitica de procesos en algunos proceos de fabricacion farmaceutica. Barcelona: Universidad Autonoma de Barcelona.

- Sacher, W. (2011). *Cianuro, la cara tóxica del oro*. Quito: Observatorio de Conflictos Mineros de América Latina (OCMAL).
- Santos da Silva, M. T., Faria Soares, C. M., Silva Lima, A., & Costapinto Santana, C. (2015). Integral production and concentration of surfactin from *Bacillus* sp. ITP-001 by semi-batch foam fractionation. *Biochemical Engineering*, 91-97.
- System, X. p. (2007). Branco, Ricardo F; Santos, Julio C; Murakami, Lucilene Y; Mussatto, Solange I; Dragone, Giuliano ; Silva, Silvio S. *Process Biochemistry*, 258–262.
- Tejeda, A., Montesinos, R., & Guzman, R. (2011). Il Recuperacion del Producto. En A. Tejeda, R. Monresinos, & R. Guzman, *Bioseparaciones, Segunda Edición* (págs. 63-201). Mexico: Pearson Educacion.
- Thomson Reuters. (2015). *Biotech funding surges*. Pricewaterhouse Coopers.
- Thomson Reuters. (2015). *MoneyTree Report Q4 2014/Full-year 2014*. Pricewaterhouse Coopers.
- Tisnadjaja, D., Gutierrez, N. A., & Maddox, I. S. (1996). Citric acid production in a bubble-column reactor using cells of the yeast *Candida guilliermondii* immobilized by adsorption onto sawdust. *Enzyme and Microbial Technology*, 43-347.
- University of Sussex, Science Policy Research Unit. (2001). *European Biotechnology Innovation System*. Brighton: University of Sussex, Science Policy Research Unit.



- Valencia, A. M., & Valencia, V. (2008). *Desarrollo de una formulacion con base en rizobacterias para la promocion del crecimiento del Banano*. Medellin: Universidad EAFIT.
- Vidhyasekaran.P, & Muthamilan, M. (1995). Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Disease*, 782-786.
- Villamil, E., & Garcia, M. (2003). Introduccion al Proyecto de Ingenieria. En E. Villamil, & M. Garcia, *Proceso de Diseño* (págs. 3-30). Buenos Aires: Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Wu, F.-C., Chou, S.-Z., & Shih, I.-L. (2013). Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis natto* in batch and fed-batch culture in fermenter. *Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 846-853.
- Yeh, M.-S., Wei, Y.-H., & Chang, J.-S. (2006). Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 1799–1805.
- Zhoua, H., Ni, J., Huang, W., Zhang, & Jiandong. (2006). Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 29-38.

**ANEXOS**  
**Anexo 1 INFORME DE MATERIALES Y CORRIENTES**

**Materials & Streams Report**  
***for corrida 10 L***

July 17, 2016

**1. OVERALL PROCESS DATA**

Annual Operating Time	7,902.72h
Unit Production Ref. Rate	349.72kg MP
Batch Size	1.15kg MP
Recipe Batch Time	54.45h
Recipe Cycle Time	25.82h
Number of Batches per Year	305.00

MP = Total Flow of Stream 'BIOMASA'

**Materials & Streams Report**  
***for corrida 100L***

July 17, 2016

**1. OVERALL PROCESS DATA**

Annual Operating Time	7,918.84h
Unit Production Ref. Rate	3,376.70kg MP
Cost Basis Annual Rate	3,376.70kg UPRF
Batch Size	11.26kg MP
Recipe Batch Time	55.14h
Recipe Cycle Time	26.30h
Number of Batches per Year	300.00

MP = Total Flow of Stream 'BIOMASA'

UPRF = Total Flow of Stream 'BIOMASA'

## Materials & Streams Report for corrida 1000L

July 17, 2016

### 1. OVERALL PROCESS DATA

Annual Operating Time	7,918.57h
Unit Production Ref. Rate	33,907.95kg MP
Batch Size	113.03kg MP
Recipe Batch Time	54.87h
Recipe Cycle Time	26.30h
Number of Batches per Year	300.00

MP = Total Flow of Stream 'BIOMASA'

## Materials & Streams Report for corrida 10000L

July 17, 2016

### 1. OVERALL PROCESS DATA

Annual Operating Time	7,901.22h
Unit Production Ref. Rate	334,370.76kg MP
Batch Size	1,129.63kg MP
Recipe Batch Time	56.16h
Recipe Cycle Time	26.59h
Number of Batches per Year	296.00

MP = Total Flow of Stream 'BIOMASA'

**Ver CD adjunto**

## Anexo 2 EVALUACION ECONOMICA DE LAS CORRIDAS

### Economic Evaluation Report for corrida 10 L

July 16, 2016

#### 1. EXECUTIVE SUMMARY (2016 prices)

Total Capital Investment	16,000 \$
Capital Investment Charged to This Project	16,000 \$
Operating Cost	31,000 \$/yr
Net Operating Cost	30,755 \$/yr
Revenues	31,000 \$/yr
Cost Basis Annual Rate	349.72 kg MP/yr
Unit Production Cost	87.94 \$/kg MP
Net Unit Production Cost	87.94 \$/kg MP
Unit Production Revenue	87.74 \$/kg MP
Gross Margin	- 0.23 %
Return On Investment	7.14 %
Payback Time	14.01 years
IRR (After Taxes)	N/A
NPV (at 7.0% Interest)	- 26,000 \$

MP = Total Flow of Stream 'BIOMASA'

### Economic Evaluation Report for corrida 100L

July 17, 2016

#### 1. EXECUTIVE SUMMARY (2016 prices)

Total Capital Investment	46,000 \$
Capital Investment Charged to This Project	46,000 \$
Operating Cost	40,000 \$/yr
Net Operating Cost	39,746 \$/yr
Revenues	40,000 \$/yr
Cost Basis Annual Rate	3,377 kg UPRF/yr
Unit Production Cost	11.77 \$/kg UPRF
Net Unit Production Cost	11.77 \$/kg UPRF
Unit Production Revenue	11.77 \$/kg UPRF
Gross Margin	- 0.01 %
Return On Investment	8.46 %
Payback Time	11.82 years
IRR (After Taxes)	N/A
NPV (at 7.0% Interest)	- 37,000 \$

UPRF = Total Flow of Stream 'BIOMASA'

**Economic Evaluation Report**  
*for corrida 1000L*

July 17, 2016

**1. EXECUTIVE SUMMARY (2016 prices)**

Total Capital Investment	317,000 \$
Capital Investment Charged to This Project	317,000 \$
Operating Cost	135,000 \$/yr
Net Operating Cost	135,480 \$/yr
Revenues	203,000 \$/yr
Cost Basis Annual Rate	33,908 kg MP/yr
Unit Production Cost	4.00 \$/kg MP
Net Unit Production Cost	4.00 \$/kg MP
Unit Production Revenue	6.00 \$/kg MP
Gross Margin	33.41 %
Return On Investment	21.73 %
Payback Time	4.60 years
IRR (After Taxes)	13.98 %
NPV (at 7.0% Interest)	153,000 \$

MP = Total Flow of Stream 'BIOMASA'

**Economic Evaluation Report**  
*for corrida 10000L*

July 17, 2016

**1. EXECUTIVE SUMMARY (2016 prices)**

Total Capital Investment	1,113,000 \$
Capital Investment Charged to This Project	1,113,000 \$
Operating Cost	535,000 \$/yr
Net Operating Cost	534,588 \$/yr
Revenues	1,622,000 \$/yr
Cost Basis Annual Rate	334,371 kg MP/yr
Unit Production Cost	1.60 \$/kg MP
Net Unit Production Cost	1.60 \$/kg MP
Unit Production Revenue	4.85 \$/kg MP
Gross Margin	67.04 %
Return On Investment	58.59 %
Payback Time	1.71 years
IRR (After Taxes)	79.92 %
NPV (at 7.0% Interest)	4,472,000 \$

MP = Total Flow of Stream 'BIOMASA'

**Ver CD adjunto**

## Anexo 3 INFORME DEL IMPACTO AMBIENTAL

### Environmental Impact Report for corrida 10 L

July 17, 2016

#### 1. WASTE GENERATION BY TYPE

1A. Aqueous Waste				
Component	kg/kg MP	kg/Batch	kg/Year	%
Amm. Sulfate	0.336	0.385	117	3.73
Biomass	0.086	0.098	30	0.95
CaChloride	0.042	0.049	15	0.47
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.008	0.009	3	0.09
Magne Sulfate	0.000	0.000	0	0.00
Molasses	0.338	0.387	118	3.75
Water	8.106	9.294	2,835	90.07
Yeast	0.085	0.097	30	0.94
<b>TOTAL</b>	<b>9.000</b>	<b>10.319</b>	<b>3,147</b>	<b>100.00</b>

### Environmental Impact Report for corrida 100L

July 17, 2016

#### 1. WASTE GENERATION BY TYPE

1A. Aqueous Waste				
Component	kg/kg UPRF	kg/Batch	kg/Year	%
Amm. Sulfate	0.038	0.423	127	0.42
Biomass	0.087	0.981	294	0.97
CaChloride	0.043	0.484	145	0.48
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.009	0.099	30	0.10
Magne Sulfate	0.000	0.001	0	0.00
Molasses	0.349	3.932	1,180	3.88
Water	8.388	94.410	28,323	93.20
Yeast	0.086	0.971	291	0.96
<b>TOTAL</b>	<b>9.000</b>	<b>101.301</b>	<b>30,390</b>	<b>100.00</b>

**Environmental Impact Report**  
*for corrida 1000L*

July 17, 2016

**1. WASTE GENERATION BY TYPE**

<b>1A. Aqueous Waste</b>				
<b>Component</b>	<b>kg/kg MP</b>	<b>kg/Batch</b>	<b>kg/Year</b>	<b>%</b>
Amm. Sulfate	0.039	4.352	1,306	0.43
Biomass	0.084	9.482	2,845	0.93
CaChloride	0.044	4.977	1,493	0.49
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.010	1.118	335	0.11
Magne Sulfate	0.001	0.147	44	0.01
Molasses	0.351	39.649	11,895	3.90
Water	8.384	947.622	284,286	93.16
Yeast	0.088	9.892	2,967	0.97
<b>TOTAL</b>	<b>9.000</b>	<b>1,017.239</b>	<b>305,172</b>	<b>100.00</b>

**Environmental Impact Report**  
*for corrida 10000L*

July 17, 2016

**1. WASTE GENERATION BY TYPE**

<b>1A. Aqueous Waste</b>				
<b>Component</b>	<b>kg/kg MP</b>	<b>kg/Batch</b>	<b>kg/Year</b>	<b>%</b>
Amm. Sulfate	0.038	42.442	12,563	0.42
Biomass	0.087	98.102	29,038	0.96
CaChloride	0.043	48.852	14,460	0.48
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.009	10.046	2,974	0.10
Magne Sulfate	0.000	0.106	31	0.00
Molasses	0.343	387.201	114,611	3.81
Water	8.394	9,482.491	2,806,817	93.27
Yeast	0.086	97.439	28,842	0.96
<b>TOTAL</b>	<b>9.000</b>	<b>10,166.678</b>	<b>3,009,337</b>	<b>100.00</b>

**Ver CD adjunto**

#### Anexo 4 DETERMINACION DE BIOMASA POR PESO SECO

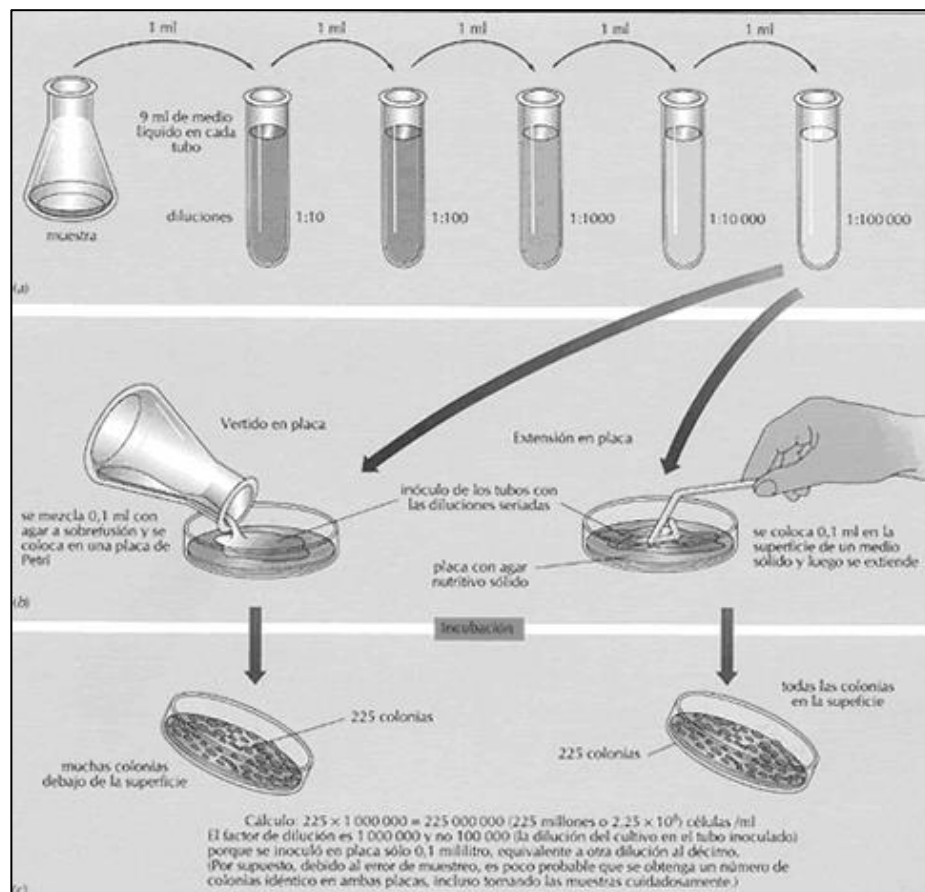
- En tres tubos de centrifugación (previamente pesados) se debe disponer en cada uno 20 ml de la muestra.
- Llevar los tubos a la centrifuga y programarla a 4 000 rpm, por un tiempo de 10 minutos.
- Separar el sobrenadante y realizar tres lavados con solución salina (0.85%)
- Descartar el sobrenadante
- Llevar las muestras a un horno a 80°C por 24 horas registrando el peso de los tubos cada 4 horas hasta peso seco constante.
- Por último se aplica la siguiente formula:

$$\text{Peso seco} = \frac{(\text{Peso tubo + muestra seca}) - (\text{Peso inicial tubo})}{\text{Volumen de la muestra}}$$



## Anexo 5 DETERMINACION DE BIOMASA POR RECUESTO EN PLACA

- Tomar 10 ml de la muestra y resuspender en 90 ml de solución salina al 0.85%.
- Preparar diluciones seriadas de 1/10, 1/ 100, 1/ 1.000, 1/ 10.000 ,1/ 100.000, 1/1.000.000 y 1/10.000.000.
- Se toma 0,1 ml de las diluciones de  $10^{-6}$ ( 1/1.000.000) y  $10^{-7}$ ( 1/10.000.000) y se siembra en superficie en agar nutritivo por triplicado
- Incubar a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48 h.
- Realizar el conteo seleccionando las placas que muestren entre 30 y 300 colonias. Reportar en UFC/ml o UFC/ g según corresponda.



## **Anexo 6 DETERMINACION DE CIANURO POR COLORIMETRIA**

Se realizó en el colorímetro multiparámetro marca ORBECO MC-500, siguiendo los siguientes pasos:

1. Llenar una cubeta (24 mm) con 2 ml de la muestra de agua y 8 ml de agua desionizada, cerrándola a continuación con su tapa.
2. Colocar el vial en el compartimento de medición verificando que las marcas estén alineadas.
3. Pulsar la tecla ZERO.
4. Sacar la cubeta del compartimento de medición.
5. Añadir 0,5 g del reactivo cianuro-11 en la muestra de agua preparada, colocar la tapa e invertir el frasco varias veces para mezclar el contenido.
6. Añadir 0,3 g del reactivo cianuro-12, colocar la tapa e invertir el frasco varias veces para mezclar el contenido.
7. Adicionar 0,15 ml gotas del reactivo cianuro-13.
8. Cerrar la cubeta con su tapa e invertir varias veces para mezclar el contenido.
9. Colocar la cubeta en el compartimento de medición verificando que las marcas estén alineadas.
10. Pulsar la tecla TEST. Esperar un período de reacción de 10 minutos.  
Después del periodo de reacción la medición se inicia automáticamente.  
El resultado se muestra en la pantalla en mg / l de cianuro.