

Tecnología de fermentación del agente biológico activo del bionematicida HeberNem®

Fermentation Technology of the Biological Active Ingredient to Produce Bionematocide HeberNem®

Dr.C. Nemeccio González-Fernández^I, Dr.C. Luís Ramos-Sánchez^{II}, Dr.C. Emilio Narciandi-Díaz^{III},

Dr.C. Orestes Mayo-Abad^{IV}, MSc. Jesús Zamora-Sánchez^I

nemeccio.gonzalez@cigb.edu.cu



^ICentro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Camagüey, Cuba; ^{II}Universidad "Ignacio Agramonte y Loynaz", Camagüey, Cuba; ^{III}Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba; ^{IV}Centro Nacional de Biopreparados, Mayabeque, Cuba

● Resumen

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Camagüey se desarrolló el producto HeberNem®, con probada actividad nematocida. En el presente trabajo se estableció el proceso de fermentación de la bacteria *Tsukamurella paurometabola*, C-924, principio activo del producto HeberNem®, sobre la base del crecimiento diaúxico del microorganismo en extracto de levadura y sacarosa como sustratos. Se realizó un pormenorizado estudio bibliográfico sobre los aspectos más importantes de las tecnologías actuales de fermentación, cultivos de alta densidad y escalado de procesos fermentativos. Se determinaron, por primera vez, las constantes cinéticas del crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo diseñado. Se desarrolló un modelo matemático del biorreactor discontinuo y se validó a escala piloto. Con el empleo de la modelación matemática se determinaron los niveles óptimos de las principales variables que controlan el proceso de fermentación a escala industrial, lo que posibilitó el desarrollo de un cultivo de alta densidad para el crecimiento del microorganismo *Tsukamurella paurometabola*, C-924, nunca antes reportado en la literatura. Con los resultados obtenidos se diseñó una tecnología limpia que contribuye a la disminución del uso de nematocidas químicos, a la reducción de las afectaciones ambientales en la lucha contra los nematodos y al incremento de los beneficios económicos de la agricultura.

Palabras clave: bionematicida, cultivo de alta densidad, *Tsukamurella paurometabola*.

● Abstract

In the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CGEB) of Camagüey, a product HeberNem®, with probed nematocidal activity, was developed. In this work the fermentation process of the bacteria *Tsukamurella paurometabola*, C-924 was established taking in account the diauxic growth of the microorganism during the consumption of yeast extract and sucrose as substrates. To develop the process different literature reports were used, specifically those related to high cell density culture and scale up of the fermentation process. Kinetic constants of the microorganism growth in the designed culture medium were determined. A mathematical model to describe the growth of the microorganism in batch culture was developed and validated at the pilot plant scale. Using mathematical modeling optimal values of the main variables of the process at industrial scale were determined. With this result a high cell density culture of the microorganism *Tsukamurella paurometabola*, C-924 was established. A clean technology was developed to minimize the agrochemical use, to diminish environmental damage in the fight against nematodes and to increase the economical benefits to the agriculture.

Keywords: bionematocide, high density cultivation, *Tsukamurella paurometabola*.

● Introducción

Los nematodos, parásitos de plantas, están entre los organismos patógenos que mayor repercusión tienen en el rendimiento de los cultivos. Además de su acción directa, la interacción que establecen con otros agentes perjudiciales conlleva a bajos rendimientos/11/.

El principal método de lucha contra los nematodos en la agricultura moderna es el uso de nematicidas químicos, pero en el mundo, y específicamente en Cuba, se hacen esfuerzos para su sustitución, debido a la alta toxicidad al hombre y animales y por los daños que ocasionan al medio ambiente /16/.

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey se aisló e identificó la bacteria *Tsukamurella paurometabola*, C-924, agente biológico activo del bionematicida HeberNem®, efectiva en el control de nematodos, específicamente en las casas de cultivos protegidos /12-14/. Hernández /10/ desarrolló un proceso fermentativo empleando fuentes de carbono complejas para la producción del bionematicida, pero los bajos rendimientos obtenidos y los elevados costos de las materias primas hacen que este proceso productivo no sea económicamente eficiente, lo cual imposibilitaba la introducción masiva del HeberNem® en nuestra agricultura y en el mercado internacional.

En las producciones biotecnológicas con microorganismos vivos, la etapa de fermentación constituye hasta el 80 % del costo de producción /15/. Para disminuir los costos de la etapa de fermentación se requiere realizar un estudio detallado de los requerimientos nutricionales del microorganismo, así como de las condiciones de cultivo /17/. Intentos previos de sustituir las fuentes de aminoácidos en el crecimiento de *Tsukamurella paurometabola*, C-924 por azúcares, dieron por resultado un crecimiento pobre e inaceptable.

Se puede emplear el crecimiento diáuxico del microorganismo para obtener una cantidad de biomasa inicial utilizando a los aminoácidos como fuente de carbono y posteriormente emplear azúcares, sustrato más barato, para incrementar la biomasa aunque a una velocidad inferior.

Así mismo, la obtención de cultivos de alta densidad celular, donde se obtengan más de 50 g L⁻¹ de biomasa seca, favorece el aumento de la productividad del proceso y, por consiguiente, la disminución de los costos de producción /4, 5, 17/. El desafío de los cultivos de alta densidad es grande e implica luchar contra el problema de la baja solubilidad del oxígeno, aspecto que se hace más limitante en la medida de que se deseen mayores densidades celulares. Con la adecuada modelación del consumo y la transferencia de oxígeno se reportan elevados rendimientos para el cultivo de diferentes microorganismos /18/.

El objetivo del presente trabajo es diseñar de forma óptima, a partir del escalado por modelación matemática, una tecnología de fermentación a escala industrial del nematicida biológico HeberNem®, basada en el uso de extracto de levadura y un sustrato más barato como fuentes de carbono, para que su producción sea técnica y económicamente factible.

● Materiales y métodos

Microorganismo. Se empleó el microorganismo *Tsukamurella paurometabola*, cepa C-924, aislado del suelo.

Condiciones de cultivo. Se empleó el medio de cultivo SD, que tiene como fuentes de carbono extracto de levadura y sacarosa /19/. El cultivo se realizó en fermentadores de tres litros (B.E. Marubishi). La temperatura de cultivo fue de 36 °C, y el pH se controló a 6,6, parámetros obtenidos anteriormente /7/.

Técnicas analíticas. La concentración celular se determinó por peso seco en balanza de peso seco Sartorius MD30A. La concentración de oxígeno se determinó con la ayuda de un sensor polarográfico de oxígeno disuelto (Ingold). La concentración de sacarosa se determinó por el método Fenol Sulfúrico /1/ y los aminoácidos del extracto de levadura presente en el medio de cultivo, por método colorimétrico empleando el reactivo de ninhidrina /2/.

Modelación matemática. Para describir el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo mixto (aminoácidos y sacarosa) se empleó un modelo matemático que refleja un crecimiento diáuxico,

descrito por Lee y colaboradores /3/. Se incluyó la ecuación de balance de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, empleando la ecuación de transferencia de

oxígeno para los reactores utilizados obtenida previamente /6/. Las ecuaciones del modelo propuesto se muestran a continuación:

Balance de formación de células

$$rX = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\mu = (\mu_A + \mu_S) \cdot \left(\frac{C_O}{K_O + C_O} \right), \quad \mu_A = \mu_{A_{Max}} \frac{C_A}{K_A + C_A}, \quad \mu_S = \mu_{S_{Max}} \frac{C_S}{(K_S + C_S) \cdot (K_I + C_A)}$$

Balance de consumo de sustratos

Aminoácidos: $rA = \frac{dC_A}{dt} = -\frac{\mu_A \cdot X}{Y_{X/A}} - m_A \cdot X$

Sacarosa: $rS = \frac{dC_S}{dt} = -\frac{\mu_S \cdot X}{Y_{X/S}} - m_S \cdot X$

Balance de oxígeno disuelto

$$rO = \frac{dC_O}{dt} = VTO - VCO = K_L a \cdot (C^*_O - C_O) - \frac{rX_A}{Y_{X/O_A}} - \frac{rX_S}{Y_{X/O_S}} - m_{O_A} \cdot X - m_{O_S} \cdot X$$

Para la obtención de los parámetros del modelo matemático se realizaron tres fermentaciones en biorreactor de tres litros, con una agitación de 12,5 s⁻¹; aireación 75 mL s⁻¹ (1,5 vvm) y presión absoluta 100 kPa. Los datos experimentales se ajustaron al modelo propuesto usando el programa Model Maker Versión 4.0 (Cherwell Scientific Ltd.) que usa el método Marquart para el ajuste por optimización numérica de los parámetros y la solución del sistema de ecuaciones diferenciales se resuelve empleando el método Runge-Kutta de cuarto orden. El modelo matemático se validó en condiciones de fermentación diferentes a las empleadas en la obtención de los parámetros del modelo. Se realizó en biorreactor de 200 L, a una presión de 150 kPa, velocidad de agitación de 10,3 s⁻¹ y con una concentración inicial de inóculo de 2,4 g L⁻¹.

Para evaluar la capacidad del modelo matemático de predecir los datos experimentales se

correlacionaron los valores experimentales con los predichos por el modelo.

Optimización. La optimización del proceso se realizó por simulación matemática empleando el software Matlab 7.0.1. En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey se está ejecutando una inversión de una planta de 1 m³ de fermentación, por tal motivo la optimización se realizó a dicha escala. El modelo matemático se vinculó a un modelo técnico económico que incluye una etapa de cosecha en centrífuga de discos y un secado por atomización descrito por Hernández /8/.

Como función objetivo se empleó el costo unitario de producción. Este criterio está en relación directa con la eficiencia técnico-económica del proceso y revela los aspectos contradictorios de las variables a optimizar que dan lugar a la existencia de una solución de compromiso. Se seleccionaron como variables del

sistema la velocidad de agitación y la relación extracto de levadura/sacarosa en el medio de cultivo. La velocidad de agitación tiene una influencia marcada en la transferencia de oxígeno, posibilitando la obtención de elevadas concentraciones celulares en el biorreactor y por consiguiente aumentando la productividad del sistema.

El carácter diáuxico del crecimiento del microorganismo *Tsukamurella paurometabola*, C924, empleando aminoácidos y sacarosa como fuentes de carbono, tiene una peculiaridad. Si el crecimiento del microorganismo se realiza fundamentalmente en aminoácidos, el tiempo de fermentación es pequeño, pero si se realiza fundamentalmente en sacarosa, el tiempo es grande.

Por otra parte, el costo de adquisición del extracto de levadura es más de 35 veces el de la sacarosa, por

lo que debe existir una relación óptima de los dos sustratos que conlleve a un mínimo costo. Para la optimización se empleó la función LSQNONLIN del Matlab, que se caracteriza porque puede dar soluciones locales de la función objetivo, empleando primero el método interior reflexivo de Newton o pueden emplearse opciones con la función OPTIMSET y aplicar el método de Levenberg-Marquart o el de Gauss-Newton

● Resultados y discusión

Obtención de los parámetros del modelo

En la figura 1 se muestra la cinética de crecimiento celular y consumo de sustratos ajustados al modelo de crecimiento diáuxico. El modelo se ajustó a los datos experimentales con un coeficiente de regresión de $R^2=0,99$.

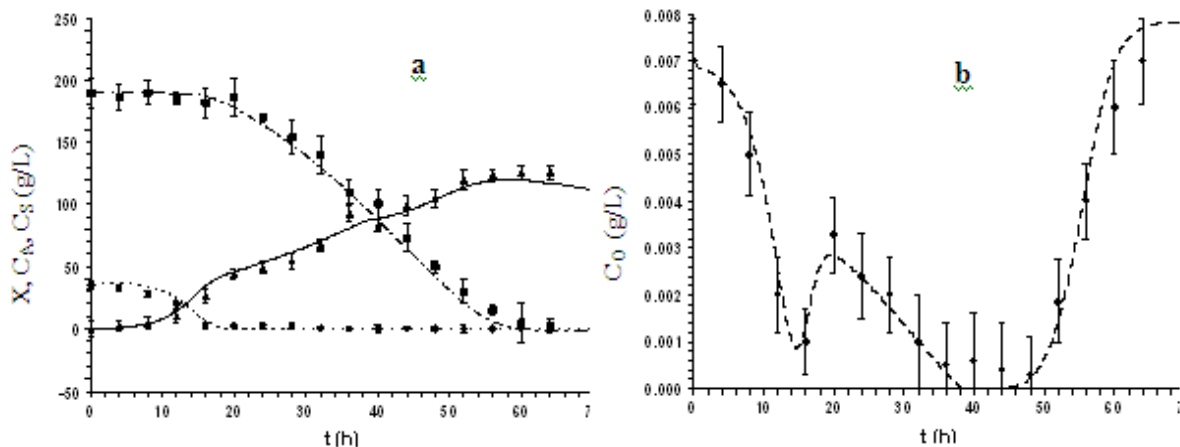


Fig. 1 Variación en el tiempo de las concentraciones de biomasa seca, de la sacarosa y los aminoácidos (a) y de la concentración de oxígeno disuelto (b) en el biorreactor de 3L.

Las determinaciones experimentales de las concentraciones se representan con los símbolos, (◆) - aminoácidos, (■) - sacarosa, (▲) - biomasa seca y (●) - oxígeno disuelto. Los valores obtenidos por el modelo se representan con las líneas: - concentración de aminoácidos, -.-.-.- - concentración de sacarosa, ——— - concentración

de biomasa seca, y ——— - concentración de oxígeno disuelto (en cada punto $n=3$).

Se puede apreciar una correlación de los datos experimentales con los predichos por el modelo. Los parámetros del modelo matemático se muestran en la tabla 1.

TABLA 2. PARÁMETROS DE AJUSTE DEL MODELO DE CRECIMIENTO DIÁUXICO DE *Tsukamurella paurometabola*, C-924 EN AMINOÁCIDOS Y SACAROSA EN BIORREACTOR DE 3 L

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
$\mu_{A_{max}}$, [h ⁻¹]	0,571 ± 0,004	m_A , [g g ⁻¹ h ⁻¹]	0,003 5 ± 0,000 7
K_A , [g/L]	27,02 ± 0,36	m_S , [g g ⁻¹ h ⁻¹]	0,005 6 ± 0,001 4
$\mu_{S_{max}}$, [h ⁻¹]	0,267 ± 0,003	Y_{X/O_2} , [g g ⁻¹]	4,0 ± 0,5
K_S , [g/L]	21,39 ± 8,96	Y_{X/O_2} , [g g ⁻¹]	1,9 ± 0,4
K_I , [g/L]	6,13 ± 0,39	m_{O_2} , [g g ⁻¹ h ⁻¹]	1 10 ⁻¹⁰ ± 0,7 10 ⁻¹¹
$Y_{X/A}$, [g g ⁻¹]	1,09 ± 0,11	m_{O_2} , [g g ⁻¹ h ⁻¹]	0,000 1 ± 0,000 05
$Y_{X/S}$, [g g ⁻¹]	0,62 ± 0,04	K_{O_2} , [g/L]	1 10 ⁻⁵ ± 0,7 10 ⁻⁶

De los valores cinéticos se puede apreciar que la velocidad máxima de crecimiento del microorganismo en aminoácidos es 2,1 veces mayor que la de crecimiento en sacarosa. Este hecho posibilita emplear el crecimiento diáxico para optimizar el proceso productivo, ya que existe una relación extracto de levadura/sacarosa que posibilita minimizar los costos de producción.

Por otra parte, se observa que el coeficiente de conversión de oxígeno en biomasa durante la etapa de crecimiento en aminoácidos es 2,1 veces mayor que el de la etapa de sacarosa. Este fenómeno hace que la demanda de oxígeno en las dos etapas sea diferente, pudiéndose

observar la limitación por oxígeno desde la etapa de crecimiento en aminoácidos, para relaciones extracto de levadura/sacarosa elevadas.

Validación del modelo matemático

En la figura 2 se muestra la correlación de los datos experimentales obtenidos a escala de 200 L de fermentación con los predichos por el modelo. Se puede apreciar que todas las variables son predichas con más de un 90 % de reproducibilidad.

Este resultado posibilita emplear el modelo matemático para la simulación de procesos en condiciones diferentes a las utilizadas para la obtención de los parámetros del modelo.

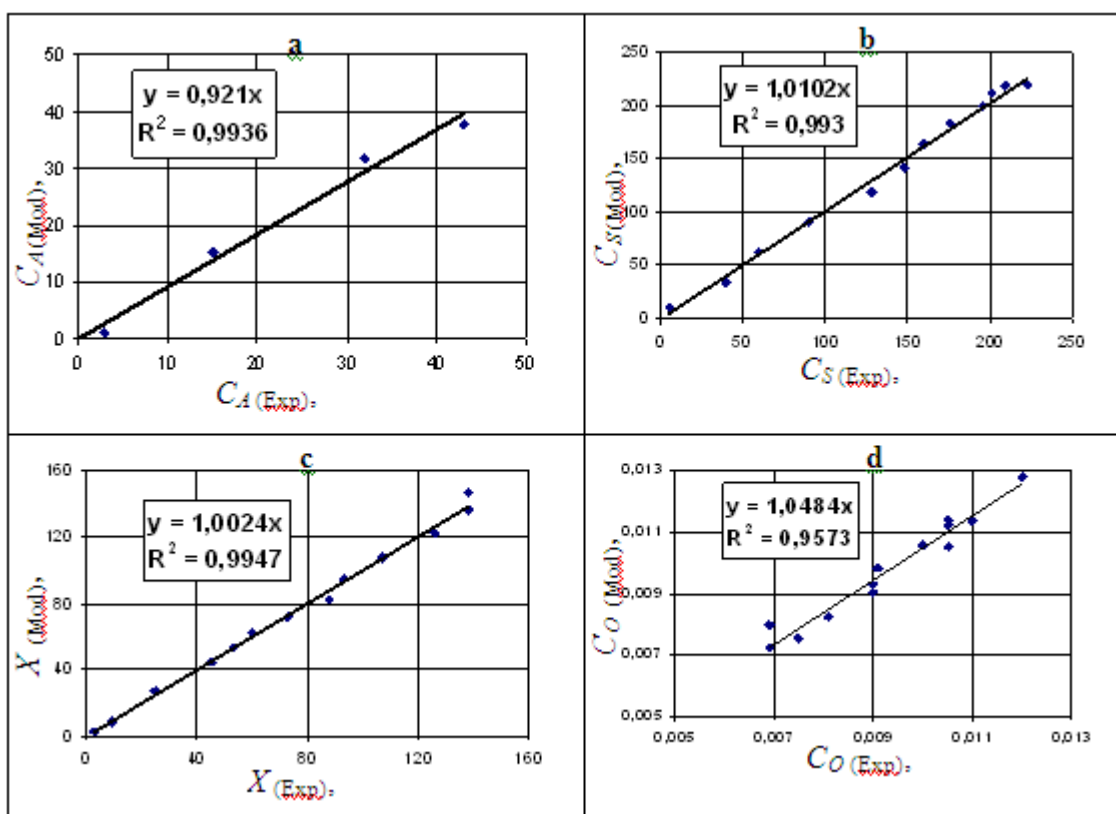


Fig. 2 Correlación de los valores de las variables dependientes medidas experimentalmente a escala de 200 L (abscisas) versus los valores predichos por el modelo (ordenadas). a- Aminoácidos; b- Sacarosa; c- Biomasa seca; d- Oxígeno disuelto.

Los puntos representan los pares de datos (experimental; modelo) y la línea sólida la regresión lineal de la forma $y = m \cdot x$. En cada gráfico se muestran los coeficientes de correlación de la regresión lineal y la ecuación obtenida.

Optimización

Se realizó una exploración de la influencia de las variables seleccionadas agitación () y relación extracto de levadura / sacarosa ($X_{EL/S}$) en la función objetivo costo de producción unitario (CP_U). La evaluación se realizó para un intervalo de agitación de 5 a $13,3 \text{ s}^{-1}$, ya que en el mismo se obtiene una correlación satisfactoria para la determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno.

La relación mínima extracto de levadura/ sacarosa para lograr el consumo máximo de la sacarosa es de 0,15 gramos de extracto de levadura

por cada gramo de sacarosa, y es este el mínimo valor evaluado.

El máximo valor evaluado fue 0,57 gramos de extracto de levadura por cada gramo de sacarosa. Con esta relación se garantiza que la última generación de células que se obtiene crece en sacarosa.

Hernández y col. /8, 9/ demostraron que la sacarosa es un protector de membrana efectivo para la conservación de las células de *Tsukamurella paurometabola*, C-924 en condiciones de desecación, por lo que, si se garantiza que la última generación de células crezca en sacarosa, se puede facilitar la estabilidad del producto después de secado.

En la figura 3 se muestra la exploración gráfica de la función objetivo en el intervalo estudiado.

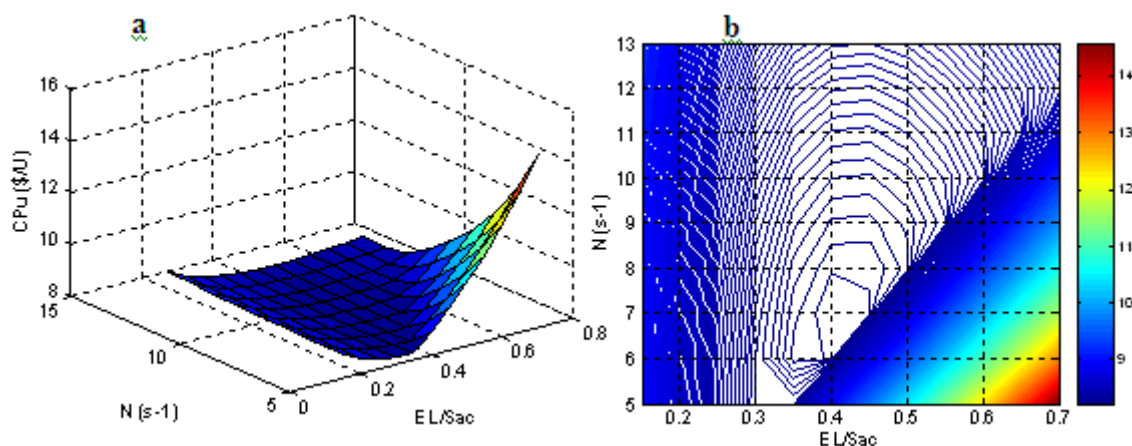


Fig.3 Influencia de la relación extracto de levadura/sacarosa ($X_{EL/S}$) y velocidad de agitación (N) en el costo de producción unitario (CP_U). a- gráfico 3D, b- gráfico de contorno.

Se puede apreciar que existe una región de mínimo para el costo de producción unitario para los valores aproximados de $X_{EL/S} = 0,4 \text{ g g}^{-1}$ y $N = 7 \text{ s}^{-1}$. El valor de mínimo costo aproximado es de $8,2 \text{ \$ U}^{-1}$, lo que hace atractiva la solución preliminar obtenida.

Se ejecutó la optimización numérica en Matlab, que terminó satisfactoriamente, y coincidió con los resultados obtenidos gráficamente. En la tabla 2 se muestra la solución obtenida.

TABLA 2. VALORES DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN EN EL PUNTO ÓPTIMO OBTENIDO

Variable	Valor
Relación Extracto de levadura/Sacarosa	$0,4 \text{ g g}^{-1}$
Agitación	7 s^{-1}
Costo unitario	$8,17 \text{ \$ U}^{-1}$

Se puede apreciar que la solución está cercana a la región de mínimo costo de la superficie de la figura 3.

Para la condición de mínimo costo obtenida, la ganancia neta anual fue 1,11 millones de pesos aproximadamente, y la productividad $18,35 \text{ Um-3h-1}$. Con esta productividad se obtienen aproximadamente 100 000 unidades de producto al año, para cubrir más de 3 000 ha de cultivo.

Este resultado posibilita cumplir con la demanda propuesta para el proyecto.

Se realizó un análisis de sensibilidad, para ello se modificó una variable en el rango de -30% a $+30\%$ y se mantuvo la otra fija en su nivel óptimo. Al valor correspondiente al óptimo se le asignó una desviación de cero por ciento. En la figura 4 se muestra el gráfico de sensibilidad obtenido.

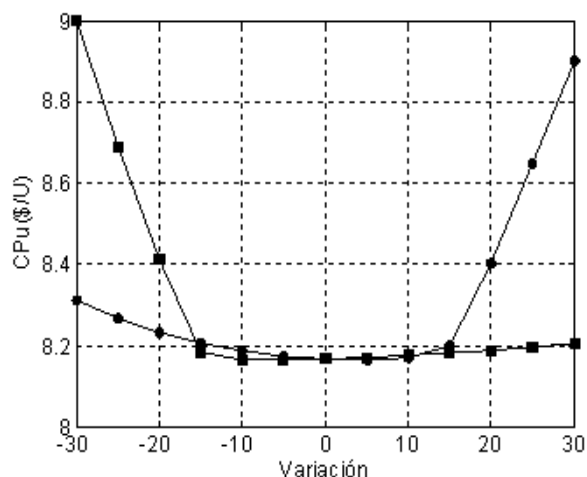


Fig. 4 Sensibilidad de la función objetivo alrededor del óptimo para cada variable. ●, relación extracto de levadura/sacarosa, ■, agitación.

Se puede apreciar que la solución es poco sensible en la región cercana al óptimo. Variaciones de hasta un 15 % en cualquiera de las dos direcciones para las dos variables no provoca grandes variaciones en el costo unitario de producción.

Para variaciones superiores a un 15 % hacia la derecha del punto óptimo para la relación extracto de levadura/sacarosa se observa un incremento brusco del costo de producción, provocado por el incremento del costo del medio de cultivo y la caída en la productividad, como producto de la limitación de oxígeno.

Para la variable velocidad de agitación se observa que para valores inferiores a un 15 % del punto óptimo ocurre un incremento del costo de producción debido a la disminución de la transferencia de oxígeno, lo cual provoca una caída en los rendimientos.

Evaluación económica de los resultados

La efectividad económica del proceso se determinó a partir de los indicadores dinámicos: el valor actual neto (VAN), la tasa interna de retorno (TIR) y el período de recuperación de la inversión (PRI), los cuales se calcularon para 10 años de explotación de la planta. Se tuvo en cuenta una inversión inicial de 1,5 millones de pesos y una tasa de interés de 12 %. Se consideró que en el primer año de explotación de la

planta solo se comercializará el 50 % de la capacidad y en el segundo año el 75 %, debido a que es un producto nuevo en el mercado, la demanda debe incrementarse paulatinamente. El precio de venta empleado fue 19,35 \$/U, el cual equivale al 50 % del precio de venta de los productos químicos, posibilitándole una mayor competitividad al producto.

Para las condiciones óptimas establecidas se obtiene un período de recuperación de la inversión de 2,43 años, valor muy favorable, ya que minimiza los riesgos de inversión. Para el horizonte de 10 años de explotación de la planta se obtiene un VAN de 3,61 millones de pesos y una TIR de 56 %. Estos valores son adecuados y reflejan la posición del producto con respecto al mercado.

Desde el 2006, que se está fabricando el bionemática HeberNem® con la tecnología propuesta en el presente trabajo, se han producido más de 10 000 unidades de producto, lo cual ha posibilitado cubrir más de 300 ha de cultivos protegidos. En la actualidad, el producto HeberNem® se aplica en todas las provincias del país.

Desde el año 2006 hasta julio del 2010 se calcula que ha habido una sustitución de importaciones (productos químicos) aproximada de 515 000 CUC, como ahorro total para el país, debido al empleo de HeberNem® en la agricultura.

En total, este producto ha sustituido hasta julio del 2010, aproximadamente, 252 toneladas de químicos tóxicos (bromuro de metilo y/o sus equivalentes como Agrocelhone y Basamid), lo cual es un indicador muy favorable en la protección del medio ambiente.



Conclusiones

Los parámetros cinéticos validados para el modelo obtenido permiten realizar estudios de simulación para diferentes escalas y condiciones de operación.

El uso del crecimiento diáuxico y de la influencia de la transferencia de oxígeno posibilitó establecer un cultivo de alta densidad con una elevada productividad y bajos costos de producción.

El modelo técnico-económico desarrollado para el proceso tecnológico permitió determinar los valores de las variables de operación que hacen mínimo el costo de producción unitario con indicadores económicos favorables para el proceso.

La evaluación técnico-económica de la tecnología propuesta, indica una toma de decisión favorable en cuanto a la inversión que se realiza

en el CIGB para la producción del HeberNem®, con un VAN de \$ 3 610 000 y una TIR de 56 % en un horizonte de diez años y con un tiempo de recuperación de la inversión de 2,43 años.

El flujo tecnológico establecido permite obtener una cantidad del bionematicida HeberNem® capaz de satisfacer la demanda nacional y comenzar la introducción del producto en el mercado internacional.

Nomenclatura

Símbolo	Significado	Unidades
$K_L a$	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	s^{-1}
μ	Velocidad específica de crecimiento celular	h^{-1}
X	Concentración celular	$g L^{-1}$
r_X	Velocidad de incremento de la masa celular por unidad de volumen	$g L^{-1} h^{-1}$
K_S	Constante del modelo cinético para sacarosa	$g L^{-1}$
K_i	Constante de inhibición del modelo cinético	$g L^{-1}$
$\mu_{A_{max}}$	Velocidad específica de crecimiento máximo en aminoácidos	h^{-1}
$\mu_{S_{max}}$	Velocidad específica de crecimiento máximo en sacarosa	h^{-1}
C_o^*	Concentración de oxígeno disuelto en condiciones de saturación	$mol L^{-1}$
C_o	Concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo	$mol L^{-1}$
Y_{X/O_A}	Coefficiente de rendimiento biomasa oxígeno en aminoácidos	$g g^{-1}$
Y_{X/O_S}	Coefficiente de rendimiento biomasa oxígeno en sacarosa	$g g^{-1}$
$Y_{X/S}$	Coefficiente de rendimiento biomasa sacarosa	$g g^{-1}$
$Y_{X/A}$	Coefficiente de rendimiento biomasa aminoácidos	$g g^{-1}$
$X_{E/S}$	Relación extracto de levadura / sacarosa en el medio de cultivo	$g g^{-1}$
K_o	Constante del modelo cinético para el oxígeno	$g L^{-1}$
m_A	Constante de mantenimiento celular en aminoácidos	h^{-1}
m_S	Constante de mantenimiento celular en sacarosa	h^{-1}
m_{O_A}	Constante de mantenimiento celular de oxígeno en aminoácidos	h^{-1}
m_{O_S}	Constante de mantenimiento celular de oxígeno en sacarosa	h^{-1}

(continuación Nomenclatura)

r_S	Velocidad de consumo de sacarosa	$g L^{-1}h^{-1}$
r_A	Velocidad de consumo de aminoácidos	$g L^{-1}h^{-1}$
V_{TO}	Velocidad de transferencia de oxígeno	$g L^{-1}h^{-1}$
K_A	Constante del modelo cinético para aminoácidos	$g L^{-1}$
C_S	Concentración de sacarosa	$g L^{-1}$
C_A	Concentración de amino ácidos	$g L^{-1}$
VAN	Valor actual neto	\$
TIR	Tasa interna de retorno	%
CP_U	Costo de producción unitario	$\$ U^{-1}$
r_O	Velocidad de variación de la concentración de oxígeno	$g L^{-1}h^{-1}$
V_{CO}	Velocidad de consumo de oxígeno	$g L^{-1}h^{-1}$
PRI	Período de recuperación de la inversión	Año
μ_A	Velocidad específica de crecimiento en aminoácidos	h^{-1}
μ_S	Velocidad específica de crecimiento en sacarosa	h^{-1}
N	Velocidad de agitación del impelente	s^{-1}



Bibliografía

- DUBOIS, M.; K. A. GILLES; J. K. HAMILTON; P. A. REBERS; F. SMITH. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". *Anal Chem.* Vol. 28, 1956, págs. 350-356.
- MOORE, S. "Amino Acid Analysis: Aqueous Dimethyl Sulfoxide As Solvent for the Ninhydrin Reaction". *J. Biol. Chem.* Vol. 243, 1968, págs. 6281-6283.
- LEE, I.; A. FREDRICKSON; M. TSUCHIYA. "Diauxic Growth of *Propionibacterium shermanii*". *Applied Microbiology.* Vol. 28, núm. 5, 1975, págs. 831-835.
- DREWS, A.; H. ARELLANO-GARCÍA. "Model-Based Determination of Changing Kinetics in High Cell Density Cultures Using Respiration Data". *Chem. Eng. Sci.* 63(19): 4789-4799, 2008.
- GURRAMKONDA, CH. *et al.* "Simple High-Cell Density Fed-Batch Technique for High-Level Recombinant Protein Production with *Pichia pastoris*: Application to Intracellular Production of Hepatitis B surface antigen". *Microbial Cell Factories*, 8:13, 2009.
- GONZÁLEZ, N. "Transferencia y consumo de oxígeno en el cultivo de alta densidad del microorganismo con actividad bionematicida *Tsukamurella paurometabola*, C-924". *Tecnología Química.* 29(3), 2009a.
- GONZÁLEZ, N.; J. ZAMORA; C. PÉREZ; E. SALAZAR; E. PÉREZ; A. HERNÁNDEZ. "Modelación de la influencia del pH y la temperatura en la velocidad de crecimiento de *Tsukamurella paurometabola*, C-924". *Tecnología Química.* 29(1): 59-62, 2009
- HERNÁNDEZ, A. "Conservación del agente nematicida *Tsukamurella paurometabola*, C-924, mediante secado por atomización". Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, 2009a.
- HERNÁNDEZ, A. *et al.* "Anhidrotic Cells of the Nematocidal agent *Tsukamurella paurometabola*, C-924". *Biotechnología Aplicada.* 26(4):339-341, 2009b.
- HERNÁNDEZ, A. "Cultivo de una cepa nematicida de *Corynebacterium paurometabolum* hasta una escala de 50 L". Tesis presentada en opción al grado académico de Master en Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, 2002.
- KOENNING, S. R. *et al.* "Survey of Crop Losses in Response to Phytoparasitic Nematodes in Unites States for 1994". *Supplement to J. Nematol.* 31 (4S): 587-618, 1999
- MENA, J. *et al.* Mechanism of Action of *Corynebacterium paurometabolum* Strain C-924 on Nematodes. *Nematology*, Vol. 4, No. 2, p. 287, 2002.
- _____. "Composiciones Pesticidas Y Antiparasitarias". MX PA03006040 A. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, 2003.
- _____. "Peztizide und Antiparasitische Zusammensetzungen". Patentanwalte von Kreisler, Selting, Werner et col, 50667 Koln.A01N 63/00, 2006.
- PETRIDES, D. "Bioprocess Design and Economics". En: Harrison, R.; Todd, P.; Rudge, S. y Petrides, D. (Eds.). *Bioseparation Science and Engineering*. Oxford University Press. Oxford: 20-23, 2003.
- SCHNEIDER, S. M.; E. N. ROSSKOPF; J. G. LEESCH; D. O. CHELLEMI; C. T. BULL; M. MAZZOLA. "Research

- on Alternatives to Methyl bromide: Pre-Plant and Post-Harvest". *Pest Manag. Sci.* 59: 814–826, 2003.
17. SHILOACH, J.; R. FASS. "Growing *E.coli* to High cell Density- A Historical Perspective on Method Development". *Biotechnol. Adv.* 23: 345-357, 2005.
18. SUN, Y. Q.; W. T. QI; H. TENG; Z. L. XIU; A. P. ZENG. "Mathematical Modeling of Glycerol Fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Concerning Enzyme-Catalytic Reductive Pathway and Transport of Glycerol and 1,3-Propanediol Across Cell Membrane". *Biochem. Eng. J.* 38(1): 22-32, 2008.
19. HERNÁNDEZ, A.; F. WEEKERS; J. MENA; C. BORROTO; P. THONART. "Freeze-Drying of the Biocontrol Agent *Tsukamurella paurometabola*, C-924. Predicted Stability of Formulated Powders". *Industrial Biotechnol.* 2 (3): 209-212, 2006.