



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y
TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA**

CENTRO DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN AGRICULTURA Y AGRONEGOCIOS SOSTENIBLES

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE MAGISTER EN AGRICULTURA Y AGRONEGOCIOS SOSTENIBLES**

**TEMA: AISLAMIENTO, PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE UN
CONSORCIO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS PARA
FERMENTACIÓN Y CONSERVACIÓN DE FORRAJES.**

AUTORES:

**BEDÓN LEÓN, LEONARDO JAVIER
QUINTANA LATORRE, MARÍA EUGENIA**

**DIRECTOR: LOAYZA VILLA, MARÍA FERNANDA M. Sc. Ph. D (c)
SANGOLQUÍ**

2018



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

CENTRO DE POSGRADOS

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “AISLAMIENTO, PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS PARA FERMENTACIÓN Y CONSERVACIÓN DE FORRAJES.”, fue realizado por el señor LEONARDO JAVIER BEDÓN LEÓN y la señorita MARÍA EUGENIA QUINTANA LATORRE, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditarlo y autorizar para que lo sustenten públicamente.

Sangolquí, 12 marzo de 2018

Fernanda Loayza M. Sc. Ph. D (c)

C.C. 1717263220



**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE
TECNOLOGÍA**

CENTRO DE POSGRADOS

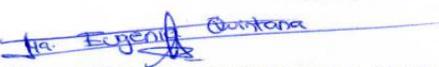
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, LEONARDO JAVIER BEDÓN LEÓN, con cédula de ciudadanía nº 1716431323 y MARÍA EUGENIA QUINTANA LATORRE, con cédula de ciudadanía nº 1714332366, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "AISLAMIENTO, PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS PARA FERMENTACIÓN Y CONSERVACIÓN DE FORRAJES.", es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando citas bibliográficas.

Consecuentemente, el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 12 marzo del 2018


LEONARDO JAVIER BEDÓN LEÓN
C.C. 1716431323


MARÍA EUGENIA QUINTANA LATORRE
C.C. 1714332366



**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE
TECNOLOGÍA**

CENTRO DE POSGRADOS

AUTORIZACIÓN

Yo, LEONARDO JAVIER BEDÓN LEÓN, con cédula de ciudadanía nº 1716431323 y MARÍA EUGENIA QUINTANA LATORRE, con cédula de ciudadanía nº 1714332366, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, publicar el trabajo de titulación: “AISLAMIENTO, PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS PARA FERMENTACIÓN Y CONSERVACIÓN DE FORRAJES.”, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 12 de marzo del 2018


LEONARDO JAVIER BEDÓN LEÓN
C.C. 1716431323


MARÍA EUGENIA QUINTANA LATORRE
C.C. 1714332366

DEDICATORIA

A mi familia, Marco Quintana, Patricia Latorre y Johanna Quintana; que conocen mis alegrías, mi dolor y mi lucha; sin su apoyo, este trabajo no hubiese sido posible.

María Eugenia Quintana Latorre

A mi familia, Elena León, José Bedón y José David, por el apoyo incondicional en mi formación personal y profesional.

Leonardo Javier Bedón León

AGRADECIMIENTO

A Dios por habernos dado la vida, fuerza y sabiduría durante toda nuestra trayectoria estudiantil.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, por ser la Institución que nos acogió y fue testigo de todo nuestro crecimiento personal y profesional.

A nuestros padres, porque ustedes han sido nuestra guía en todo este camino, educadores y amigos.

A nuestra directora, Fernanda Loayza, quien nos guió acertadamente y contribuyó con el desarrollo y culminación del presente trabajo de tesis.

Leonardo Javier Bedón León

María Eugenia Quintana Latorre

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.1. Formulación del problema.....	1
1.2. Justificación del problema.....	3
1.3. Objetivos de la investigación.....	6
1.3.1. Objetivo General	6
1.3.2. Objetivos Específicos.....	6
CAPÍTULO 2.....	7
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Bacterias ácido-lácticas.....	7
2.1.1. Origen	7
2.1.2. Características de <i>Lactobacillales</i>	9
2.1.3. Funciones y aplicaciones de las BAL.....	12
2.2. Ácido láctico.....	14
2.3. Alimentación en ganado.....	15
2.3.1. Ensilaje.....	17
2.4. Producción de microorganismos a gran escala.....	18

2.4.1.	Biorreactores.....	18
2.4.1.1.	Reactores de flujo continuo.....	20
2.4.1.2.	Digestor de mezcla completa.....	21
2.4.1.3.	Reactores de flujo en pistón.....	21
2.4.1.4.	Reactores de flujo discontinuo.....	22
2.4.2.	Diseño de biodigestores.....	22
2.4.2.1.	Temperatura.....	23
2.4.2.2.	pH.....	24
2.4.2.3.	Relación carbono/nitrógeno.....	24
2.4.2.4.	Agitación.....	25
2.5.	Comercialización y/o marketing.....	26
2.5.1.	Tipos de marketing.....	27
2.5.2.	Análisis de marketing.....	28
2.5.2.1.	Análisis interno:.....	28
2.5.2.2.	Análisis externo.....	31
2.5.2.2.1.	Microentorno:.....	31
2.5.2.2.2.	Macroentorno.....	33
2.5.3.	Segmentación de mercados.....	35
2.5.4.	Mezcla de marketing.....	37
2.5.4.1.	Producto.....	38
2.5.4.1.1.	Estrategias de Producto.....	38
2.5.4.2.	Precio.....	42
2.5.4.2.1.	Estrategias de Precios.....	43
2.5.4.3.	Plaza.....	44
2.5.4.3.1.	Estrategias de Distribución.....	45
2.5.4.4.	Promoción.....	46
2.5.4.4.1.	La mezcla de Promoción.....	47
2.5.4.4.2.	Estrategias de Promoción.....	49
2.5.5.	Posicionamiento.....	50
2.5.5.1.	Proceso de posicionamiento.....	50

2.6.	Hipótesis	56
CAPÍTULO 3.....		57
MATERIALES Y MÉTODOS		57
3.1.	Ubicación geográfica de la investigación	57
3.2.	Obtención de forrajes	57
3.3.	Aislamiento de BAL	59
3.4.	Identificación de BAL	59
3.5.	Determinación de la cinética celular.....	60
3.6.	Determinación de concentración de ácido láctico	62
3.7.	Diseño del biorreactor	63
3.7.1.	Volumen del digestor	65
3.7.2.	Volumen funcional del digestor	65
3.7.3.	Carga inicial del inóculo	66
3.7.4.	Volumen del sustrato.....	66
3.7.5.	Mezclado	68
3.7.6.	Cálculo del tiempo de residencia	69
3.8.	Plan de negocio	69
3.8.1.	Investigación del mercado.....	69
3.8.2.	Dimensionamiento del mercado.....	70
3.8.3.	Diseño de investigación	71
3.8.3.1.	Diseño de Encuesta	71
3.8.4.	Población	74
3.8.5.	Muestra	74
CAPÍTULO 4.....		76
RESULTADOS		76
4.1.	Investigación técnica	76
4.1.1.	Aislamiento de bacterias ácido-lácticas (BAL)	76
4.1.2.	Identificación de las bacterias ácido – lácticas.....	78
4.1.3.	Determinación de la cinética celular.....	80
4.1.4.	Concentración ácido láctico	87

4.2.	Biorreactor para la producción del BAL.....	89
4.3.	Resultado de la investigación de mercado.....	90
CAPÍTULO 5.....		103
PROPUESTA DE COMERCIALIZACIÓN Y/O MARKETING		103
5.1.	Historia, misión y visión Empresarial	103
5.2.	Análisis Situacional del mercado	104
5.3.	FODA.....	105
5.3.1.	Estrategias FODA.....	106
5.3.2.	Análisis FODA.	107
5.4.	Marketing Mix	111
5.4.1.	Producto	111
5.4.1.1.	Descripción del producto	111
5.4.1.2.	Nombre del producto	113
5.4.2.	Precio	116
5.4.2.1.	Estrategia de precio.....	117
5.4.3.	Plaza.....	118
5.4.4.	Promoción	119
5.4.4.1.	Venta personal	119
5.4.4.2.	Publicidad	121
CAPÍTULO 6.....		124
DISCUSIÓN.....		124
CAPÍTULO 7.....		128
CONCLUSIONES.....		128
CAPÍTULO 8.....		130
RECOMENDACIONES		130
CAPÍTULO 9.....		131
BIBLIOGRAFÍA.....		131

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Composición del sustrato</i>	67
Tabla 2. <i>Formulación preparada para el llenado del biorreactor.</i>	67
Tabla 3. <i>Resultados de la prueba piloto de aceptación o rechazo de uso de un bioinoculante</i>	74
Tabla 4. <i>Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas del producto.</i>	106
Tabla 5. <i>Estrategias FODA</i>	107
Tabla 7. <i>Precio de SILOLAC de acuerdo a sus presentaciones</i>	117
Tabla 8. <i>Porcentajes de descuentos en base a la cantidad de producto pedido</i>	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los géneros más relevantes de BAL en el reino Bacteria tomada de base de datos “Taxonomy”, del National Center for Biotechnology.	9
Figura 2. Descripción de la vía homofermentativa y heterofermentativa de las BAL.....	11
Figura 3. Canales de Marketing de consumo e industriales.	45
Figura 4. Recolección, transporte y picado de la materia vegetal.....	58
Figura 5. Simulación de proceso de ensilaje en tubo de PVC.	58
Figura 6. Diseño del ensamblaje del biorreactor.....	64
Figura 7. Esquema del diseño de agitación del biorreactor.	68
Figura 8. Recuento de bacterias ácido-lácticas a partir de muestras de silo de maíz (A), Cebada (B) y Avena (C).....	77
Figura 9. Resultados de la identificación bioquímica utilizando API CH 50L (Biomerieux).	79
Figura 10. Parámetros de evaluación para el recuento de colonias en la caja Petri y ventana de resultados del software Open CFU vs 3.9.0.....	80
Figura 11. A. Ensayo de cinética de crecimiento (Log base 10 de UFC/ml vs tiempo) B. Ajuste de la curva de crecimiento en el medio de cultivo industrial al modelo matemático Baranyi and Roberts (software Combase).....	82
Figura 12. Análisis de varianza (ANOVA) para los medios de cultivo utilizados en la cinética de crecimiento.	83
Figura 13 Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los medios de cultivo C1 y C2 para la cinética de crecimiento.	84

Figura 14. Gráfica descriptiva de la normalidad de la variable densidad celular respecto a los medios de cultivo C1 y C2.....	84
Figura 15. Curva del pH en función del tiempo en horas.....	85
Figura 16. Análisis de varianza (ANOVA) para los medios de cultivo utilizados en base a la variable de respuesta pH.	86
Figura 17. Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los medios de cultivo C1 y C2 para la cinética de crecimiento.	86
Figura 18. Concentración de ácido láctico en medio de cultivo C1 y C2.	87
Figura 19. Análisis de varianza (ANOVA) para los medios de cultivo utilizados en base a la variable de respuesta pH.	88
Figura 20. Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los medios de cultivo C1 y C2 para la variable concentración de ácido láctico.	88
Figura 21. Biorreactor para la producción de consorcio de BAL.....	89
Figura 22. Número de vacas lecheras en el hato.	91
Figura 23. Producción de leche en litros por día.....	92
Figura 24. Promedio de producción diario de leche por vaca ordeñada.....	93
Figura 25. Suplemento alimenticio en la dieta diaria de ganado lechero.....	94
Figura 26. Uso de silo en la dieta diaria en ganado lechero.	95
Figura 27. Adquisición de silo como suplemento alimenticio.	96
Figura 28. Materias primas empleadas en la elaboración de silos.	97
Figura 29. Producción de silo en toneladas por año.....	98
Figura 30. Uso de microorganismos en la fermentación y conservación de silos.....	99
Figura 31. Apertura al uso de microorganismos productores de ácido láctico en la elaboración de silo.....	100
Figura 32. Preferencia en la presentación del producto por parte de productores de silo.	101

Figura 33. Consideración del uso de microorganismos en la producción de silo.....	102
Figura 34. Aplicación de consorcio de <i>Lactobacillus</i> en ensilaje de maíz.....	112
Figura 35. Presentación de 1 litro del producto SILOLAC.	113
Figura 36 Presentación de 4 litros de SILOLAC.	114
Figura 37 Presentación caneca de 20 litros de SILOLAC.....	114
Figura 38. Diseño de etiqueta frontal.....	115
Figura 39. Diseño de etiqueta posterior.....	116
Figura 40. Venta directa a los consumidores.....	121
Figura 41. Utilización de Facebook como medio digital para publicidad.....	122
Figura 42. Participación en ferias y material promocional.	123

RESUMEN

La Biotecnología ha desarrollado diversas estrategias enfocadas en la transformación, procesamiento y mantenimiento de alimentos complementarios. El ensilaje permite conservar forrajes en ambientes anaerobios, controlados y prolongados, con el fin de enfrentar épocas donde la materia seca disminuye o decae su valor nutricional. Esta investigación demostró que los consorcios microbiológicos nativos pueden ser aislados, identificados y escalados, con el fin de obtener un aditivo para la fermentación y conservación de forrajes. Se aislaron e identificaron *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, y *Lactobacillus collinoides* a partir de maíz, cebada y avena. Los *Lactobacillus* mezclados equitativamente demostraron su eficiencia para consumir carbohidratos y producir ácido láctico. La cinética de crecimiento se evaluó en dos medios de cultivos alternativos bajo condiciones controladas de laboratorio durante 72h. El consorcio generó 7.9 g/L de lactato, con pH 3.5, en un sustrato compuesto por 5.05% de proteína, 5.53% de carbohidrato y 89.42% de humedad. Se diseñó un biorreactor de 200 L para la propagación industrial del consorcio en 48h de residencia para alcanzar una población de 1×10^9 UFC/mL, adecuada para su uso como aditivo. La aceptación del producto fue evaluada con una encuesta, tomando al cantón Mejía, provincia de Pichincha, como mercado objetivo; el 64.1% de los productores han elaborado silo y 96.92% de ellos están dispuestos a emplear microorganismos como agentes de conservación de sus silos. Se realizó la mezcla de marketing para la comercialización del producto con el nombre de "SILOLAC". Finalmente, el producto formulado con tres especies de *Lactobacillus* nativos demostró ser un aditivo eficiente en procesos de ensilaje, con una gran opción de mercado entre los productores de la zona sur de la provincia de Pichincha.

Palabras claves:

- BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS
- ENSILAJE
- PLAN DE MARKETING
- BIOINOCULANTE.

ABSTRACT

Biotechnology has developed several strategies focused on the transformation, processing and maintenance of complementary foods. The silage allows to conserve forage in anaerobic, controlled and prolonged environments, in order to face times when the dry matter decreases or its nutritional value declines. This research showed that the native microbiological consortiums can be isolated, identified and scaled, in order to obtain an additive for the fermentation and conservation of forages. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactobacillus collinoides* were isolated and identified from corn, barley and oats. The *Lactobacillus* mixed equally demonstrated their efficiency to consume carbohydrates and produce lactic acid. Growth kinetics were evaluated in two alternative culture media under controlled laboratory conditions for 72h. The consortium generated 7.9 g / L of lactate, with pH 3.5, in a substrate composed of 5.05% protein, 5.53% carbohydrate and 89.42% humidity. A 200 L bioreactor was designed for the industrial propagation of the consortium in 48h of residence to reach a population of 1×10^9 CFU / mL, suitable for use as an additive. The acceptance of the product was evaluated with a survey, taking the canton Mejía, province of Pichincha, as the target market; 64.1% of the producers have elaborated silo and 96.92% of them are willing to use microorganisms as agents for the conservation of their silos. The marketing mix was made for the marketing of the product under the name of "SILOLAC". Finally, the product formulated with three native *Lactobacillus* species proved to be an efficient additive in silage processes, with a great market option among producers in the southern zone of the province of Pichincha.

Keywords

- **LACTIC ACID BACTERIA**
- **SILAGE**
- **MARKETING PLAN**
- **BIO-INOCULANT.**

CAPÍTULO 1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Formulación del problema

El Ecuador es un país cuya base económica principal hasta 1970 fue la agricultura (Waters, 1993). Luego a pesar del importante aporte del sector petrolero, la agricultura ofrece al país una ocupación laboral correspondiente al 25% de la población económicamente activa, según datos del Banco Central del Ecuador (2014).

La topografía y clima variados del país facilitan la producción diversificada de verduras, frutas y hortalizas, así como también la producción de forrajes y pastos para la alimentación de rumiantes y mamíferos pequeños, que son una fuente importante de proteína animal para consumo interno (Guerrero, Sumba, & Salvador, 2014). Según describe Lema (2017), tan solo el 13% de la superficie dedicada a la agricultura es apropiada para el desarrollo de pastizales.

Para optimizar la producción, el sector pecuario demanda de alimentos de alta calidad que son administrados a los animales en busca de mejoras zootécnicas inmediatas (Ocanto, Acevedo, & García, 2014).

En los bovinos, la producción de leche de alta calidad y volumen es una de las características de mayor impacto. Para conseguirlo, se han diseñado varios insumos y suplementos alimenticios que mejoran la capacidad productiva basada en el metabolismo animal (Tobía, Rojas, Villalobos, Soto, & Uribe, 2004).

Entre los suplementos de mayor impacto se describe los forrajes fermentados (silo) en los cuales se favorece el crecimiento de bacterias ácido-lácticas en ambientes anaerobios, controlando el crecimiento de patógenos y otorgando a los animales una fuente de nutrientes constante y enriquecida (Cobos, 2007).

La práctica del ensilaje contrarresta el efecto negativo que provocan los períodos secos; la pobre disponibilidad de forrajes tanto en cantidad como en calidad, dando lugar a la disminución en la producción de leche y carne (Tobía, Rojas, Villalobos, Soto, & Uribe, 2004). La conservación de forrajes a través del ensilaje garantiza la disponibilidad de un aporte nutritivo que asegure la producción del ganado bovino durante períodos de escasez (Díaz, 2014).

Para mejorar la eficiencia del proceso de ensilaje de los forrajes, se requiere de la adición de inoculantes microbianos formulados a partir de mezclas de bacterias aisladas y caracterizadas, cuya utilidad es la de establecerse como cultivo dominante en el silo (Ulloa, Ramírez, Rosas, Velázquez, & Arce, 2011) (Zambrano, 2013); garantizando la inocuidad microbiológica de los sistemas e incrementando la palatabilidad de alimentos ricos en fibra y proteínas (Ogunade, y otros, 2016) (Díaz, 2014) (Tobía, Rojas, Villalobos, Soto, & Uribe, 2004).

La aplicación de inóculos bacterianos garantizados invita a los productores a promover y aplicar prácticas y tecnologías de producción que permitan afianzar la inocuidad de los alimentos (LORSA, Ley Orgánica de Régimen y Soberanía Alimentaria, 2010).

La constitución del Ecuador establece principios que garantizan la soberanía alimentaria, la producción sustentable y respetuosa con el medio ambiente, la

conservación de los ecosistemas y el desarrollo igualitario. Algunos artículos en la constitución prohíben el ingreso de organismos genéticamente modificados (OGM), que puedan alterar el patrimonio genético nacional y que se caractericen como perjudiciales.

Para velar por la soberanía genética del Ecuador, y debido a que la importación de inoculantes bacterianos con fines de aplicación agropecuaria es limitada y costosa; se hace necesario proporcionar insumos biológicos nativos, requeridos por la agroindustria por su impacto en la productividad, promoviendo la identificación y caracterización de microorganismos endémicos aplicados en la conservación de forrajes y asegurar la producción de los bovinos en períodos de escasez.

Este trabajo establece un proceso de bio-aumentación de inoculantes nativos en los procesos de fermentación otorgando un impacto positivo en la calidad del silo, y la disponibilidad de este producto en el mercado con factibilidad de uso a pequeña, mediana y gran escala.

1.2. Justificación del problema

Según datos de la Encuesta de Superficie y producción agropecuaria continua (ESPAC) de 2010, el sector pecuario de mayor impacto es el bovino con 5,3 millones de cabezas de ganado, lo que se asocia con una producción de leche de alrededor de 4 millones de litros para el mismo año. El 64,5% de la producción lechera es de la región sierra.

Para el 2017 la producción de leche en el país fue de 5,5 millones de litros; solo en la provincia de Pichincha la producción alcanzó 1,2 millones de litros (Datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería).

El consumo per cápita de leche en el Ecuador fue de 100 litros para el año 2015 (DEPROSUR, 2017). Eso significa que existe una demanda insatisfecha desde el sector productivo.

La producción de leche está ligada a la nutrición animal (Patty-Quispe, y otros, 2017). Aproximadamente el 42% de la tierra cultivada en el Ecuador está destinada a pastos (5 millones de hectáreas aproximadamente) y los fenómenos climáticos (inundaciones o sequías) afectan la calidad y cantidad de los pastos disponibles (Cobos, 2007).

El ensilaje es una alternativa de alto rendimiento que garantiza la disponibilidad de alimento para los animales durante todo el año (Cubero, Rojas, & WingChing, 2010). La optimización de la composición nutricional del silo tiene un alto impacto en la productividad de los animales (Garcés, Berrio, Ruiz, Serna, & Builes). Los bioinoculantes (bacterias ácido-lácticas o BAL) han sido ampliamente utilizados en procesos fermentativos que optimizan el tiempo del proceso de ensilaje y otorgan beneficios a los productores por manejo económico de los hatos durante todo el año (Klein, 1994).

La industria biotecnológica ecuatoriana es un área naciente y aún no ha desarrollado estrategias de producción de microorganismos a gran escala como herramientas de optimización de la actividad agropecuaria (Bota, 2003). Las causas asociadas incluyen la falta de financiamiento, difusión de investigaciones nacionales,

acceso a la tecnología o carente vinculación de la investigación académica e industrial (Taípe, 2009).

La propagación de microorganismos con potenciales efectos benéficos se hace de forma artesanal, sin parámetros de bioseguridad, trazabilidad, seguimiento u optimización (Bedon, 2017).

Es necesario identificar microorganismos nativos, determinar consorcios y evaluar su cinética y capacidad de catalizar la fermentación anaerobia de forrajes, para establecer un proceso de producción a gran escala y ofrecerlo como un producto alternativo, fácilmente disponible y de aplicación factible para el sector agropecuario de forma que los actores del proceso productivo conozcan el uso racional de microorganismos para incrementar sus niveles de producción lechera y cárnica (Tobía, Rojas, Villalobos, Soto, & Uribe, 2004).

Existen una serie de beneficios industriales obtenidos por la utilización de microorganismos en la obtención de alimentos de consumo humano y animal (Ogunade, *et al*, 2016).

La generación de inóculos bacterianos con estrictos estándares de calidad, de acuerdo con la Ley Orgánica de Soberanía Alimentaria, debe garantizar la inocuidad de los alimentos, promover una adecuada nutrición y prevenir la incidencia de enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados.

La empresa BIOAGROPEC tiene interés por desarrollar tecnología propia en el ámbito de los aditivos biológicos para el proceso de ensilaje, por ello es necesario aislar, caracterizar y evaluar cepas bacterianas autóctonas que tengan información genética para trabajar y adaptarse a sustratos también autóctonos y abundantes, lo

cual resulta de gran interés científico, tecnológico, económico y social; estas cepas forman parte de diversos nichos ecológicos que la naturaleza ha diseñado, y están disponibles para ser estudiados y aprovechados.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo General

Generar una tecnología sostenible para la fermentación y conservación de forrajes, mediante el aislamiento, producción y comercialización de un inoculante de bacterias ácido-lácticas.

1.3.2. Objetivos Específicos

Aislar e identificar el inóculo de bacterias ácido-lácticas asociadas a la microbiota de tres tipos de forrajes.

Generar una producción en escala del consorcio de bacterias ácido-lácticas en medio semi-industrial en un biorreactor tipo “batch” de flujo continuo.

Desarrollar un plan de negocios para la comercialización del consorcio microbiano aislado y evaluado para la fermentación de forrajes.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. Bacterias ácido-lácticas

2.1.1. Origen

El término bacterias ácido-lácticas (BAL) abarca a un grupo heterogéneo de microorganismos cuya principal característica es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares (Aznar & Zúñiga, 2011).

El uso de BAL es ancestral y se evidencia en la producción de alimentos tales como queso y yogurt. Sin embargo, no fue hasta mediados del siglo XIX cuando Louis Pasteur demostró que la producción de ácido láctico en fermentaciones se debía a la acción de microorganismos (fermentos lácticos) (Parra, 2010).

El aislamiento y obtención de un cultivo puro de *Bacterium lactis* por Joseph Lister marcó el inicio del estudio microbiológico de la fermentación láctica de la leche (Santer, 2010).

En 1900 Henry Tissier aisló de las heces de un lactante la primera bifidobacteria a la que llamó *Bacillus bifidus*. Se trataba de un organismo Gram positivo y productor de ácido láctico por lo que en la primera clasificación se incluyó con las bacterias ácido-lácticas (Aznar & Zúñiga, 2011).

En 1917 Winslow propuso la familia *Lactobacillaceae* para agrupar bacterias con los siguientes rasgos: bacilos Gram positivos, a menudo largos y delgados,

inmóviles, no esporulados, comúnmente producen ácido láctico a partir de azúcares, pueden producir gas (dióxido de carbono), no producen hidrógeno, ocasionalmente termófilos, difícilmente cultivables en medio gelificado incubado en atmósfera microaerófila. Dentro de esta familia se incluía *Bacillus bifidus* (Aznar & Zúñiga, 2011).

Sin embargo, a comienzos de los años 30 empezaron a obtenerse datos que señalaban que las bifidobacterias estaban más próximas a los Actinomycetes que a los lactobacilos. Esta afirmación fue luego confirmada con análisis moleculares realizados a partir de 1960 que terminó con la separación filogenética de los dos grupos bacterianos basada en el análisis de ADN ribosómico (Aznar & Zúñiga, 2011).

En la actualidad lo que se conoce como BAL agrupa a bacterias del orden Lactobacillales y bacterias del orden Bifidobacteriales.

En la Figura 1, se muestra la clasificación de ambos grupos con los géneros más relevantes en alimentación y salud.

Filo	Clase	subclase	Orden	Familia	Género
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteridae</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>		<i>Lactobacillales</i>	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>
				<i>Caenobacteriaceae</i>	<i>Enterococcus</i>
				<i>Enterococcaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
				<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Pediococcus</i>
				<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>
				<i>Streptococcaceae</i>	<i>Oenococcus</i>
					<i>Weissella</i>
	<i>Lactococcus</i>				
	<i>Streptococcus</i>				

Figura 1. Clasificación de los géneros más relevantes de BAL en el reino Bacteria tomada de base de datos “Taxonomy”, del National Center for Biotechnology.

Fuente: (Aznar & Zúñiga, 2011).

2.1.2. Características de *Lactobacillales*

Existen 19 géneros de bacterias que se agrupan como BAL, estas bacterias están distribuidas en 6 familias dentro del orden *Lactobacillales*. Forman un grupo muy heterogéneo de bajo contenido en G+C dentro del filo *Firmicutes* (Parra, 2010).

Morfológicamente se pueden observar como bacilos o cocos Gram positivos de longitud variable y 0.5 – 0.8 μm de diámetro. Prefieren una atmósfera de crecimiento carente de oxígeno o con una concentración de 5% de CO_2 , carecen de enzimas catalasas, no poseen citocromo oxidasa y no forman esporas. Algunos BAL

requieren aminoácidos y vitaminas como lactoflavina, biotina, ácido pantoténico, ácido fólico, ácido nicotínico o tiamina para crecer (Parra, 2010). Dada su capacidad de producir ácidos a partir de fuentes orgánicas de carbono como los carbohidratos, se pueden clasificar como acidófilos o ácido-tolerantes, quimioorganotrofo. El ácido láctico es el principal producto de la fermentación de azúcares por vía homofermentativa sin descartar otros productos de ácidos orgánicos como acetato, formato, succinato en la vía heterofermentativa (Ulloa, Ramírez, Rosas, Velázquez, & Arce, 2011), (Parra, 2010).

Entre los BAL de forma redondeada (cocos) se describe a *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* o *Streptococcus*, con número de especies limitado (Parra, 2010). Entre los bacilos se destaca el género *Lactobacillus*, con más de 100 especies descritas (Aznar & Zúñiga, 2011).

La temperatura de crecimiento favorable para BAL varía entre 15° y 45°C (Aznar & Zúñiga, 2011). En condiciones de laboratorio, el medio de cultivo usualmente utilizado para la proliferación de BAL es Man Rogosa Sharpe (MRS), que se caracteriza por su formulación basada en peptona y glucosa como fuente de nitrógeno y carbono respectivamente (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960). El citrato de amonio es un agente selectivo que inhibe el crecimiento de enterobacterias; otros inhibidores selectivos son el monoleato de sorbitán, magnesio, acetato que a su vez actúan como cofactores (Nair & Suprendran, 2005).

Las hexosas como glucosa, manosa, galactosa o fructosa son el sustrato preferido en la vía homofermentativa y es óptimo en la producción exclusiva de ácido láctico (figura 2) (Aznar & Zúñiga, 2011).

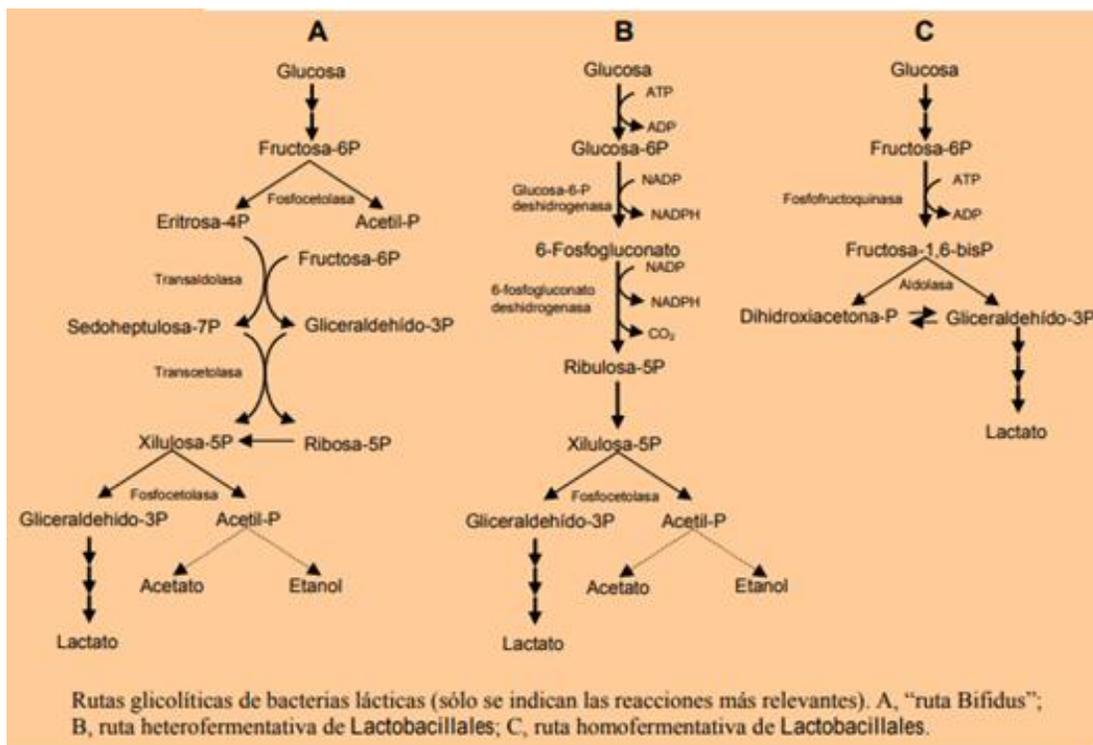


Figura 2. Descripción de la vía homofermentativa y heterofermentativa de las BAL.

Fuente: (Aznar & Zúñiga, 2011).

Las bacterias pueden ser homo o heterofermentativas dependiendo de su arsenal enzimático, caracterizándose, la fructosa-1,6-bifosfato-aldolasa en el primer caso, y una fosfoacetolasa, en el segundo (Aznar & Zúñiga, 2011). A su vez, el mecanismo de fermentación puede ser estricto o facultativo dependiendo de la bacteria o el azúcar que se utilice como sustrato (Parra, 2010).

Todas las BAL, excepto aquellos *Lactobacillus* homofermentadores estrictos, pueden fermentar las pentosas porque su degradación se restringe a la ruta heterofermentativa (Parra, 2010).

En la industria, los género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, son ampliamente utilizados en la producción de ácido láctico, entre los *Lactobacillus* se destacan 125 especies y subespecies (Limsowtin, Broome, & Powell, 2003).

2.1.3. Funciones y aplicaciones de las BAL

Los BAL son exitosos en ambientes con concentraciones altas de carbohidratos, la industria enfoca esfuerzos importantes el estudio de BAL por la obtención eficiente de metabolitos importantes como ácido láctico y péptidos de cadena corta con actividad antimicrobiana denominadas bacteriocinas (Aznar & Zúñiga, 2011).

En el área de los alimentos los BAL son utilizados como preservantes, incrementan la vida útil de los productos, y mantienen y/o transforman las características organolépticas y calidad microbiológica del producto alimenticio debido a su acción antagónica frente a los microorganismos deterioradores de los alimentos (Sáenz & Ramos Gorbeña, 2008).

El uso o aplicación de BAL está relacionado con la implementación de procesos técnicos novedosos con grandes impactos productivos en la industria de producción de alimentos (Ramirez, Rosas, Velázquez, Ulloa, & Arce, 2011).

En nutrición animal, el ensilaje es una alternativa de preservación de forrajes que garantiza la nutrición de los bovinos y otros herbívoros en épocas de escases de alimento por las condiciones cíclicas del cultivo de forrajes y otros fenómenos ambientales o climáticos que limitan la disponibilidad de alimento para el ganado (Díaz, 2014). Las BAL son parte de la microbiota acompañante natural de los forrajes y son actores primordiales del proceso de ensilaje, sin embargo, su concentración es un limitante que prolonga y encarece el proceso. Además, la habilidad superior de otros microorganismos de crecer bajo las mismas condiciones incrementa la probabilidad de un metabolismo fermentativo perjudicial, que da lugar a la putrefacción y pérdida del forraje (Villa, 2008).

La bioaumentación se define como la adición de inoculantes bacterianos de metabolismo conocido, sobre sustratos estudiados. La adición de consorcios de BAL homofermentadores en el ensilaje es una alternativa que por la producción de ácidos orgánicos ayuda a disminuir rápidamente el pH del sustrato, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y levaduras. Además, conserva las propiedades nutricionales, sobre todo la fuente de proteína existente del forraje y mantiene la materia seca con una pérdida no mayor al 3% (Contreras, Marsalis, & Lauriault, s/a). El suministro de esta fuente de alimento en épocas de escases de pasto mejora la productividad general de los animales entre un 3 y 5% (Muck & Contreras, 2006).

2.2. Ácido láctico

El ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico), es un ácido orgánico de peso molecular aproximado de 90g/mol que se aisló en 1780 por Scheele en Suecia. La fuente de aislamiento fue la leche agria. Después, Blonodeaur en 1847 lo describe como un producto de un proceso de fermentación y Littlelon (1881) escala el proceso de fermentación en la industria (Serna-Cock & Rodriguez, 2005).

Además de la industria de alimentos, el ácido láctico es utilizado en farmacéutica, cosmética y química (Serna-Cock & Rodriguez, 2005). La investigación en esta área se enfoca en la prospección de fuentes diversas de sustratos sustentables, la implementación de herramientas tecnológicas dinámicas y alcanzables, sistemas de separación y la descripción novedosa de microorganismos novedosos con demostrada habilidad para generar concentraciones incrementadas de ácido láctico con rendimiento y productividad (Serna-Cock & Rodriguez, 2005).

En la naturaleza, se pueden describir dos formas isoméricas del ácido láctico, que difieren por la localización espacial de los grupos químicos característicos alrededor del carbono quiral. Los dos isómeros pueden polimerizarse, sin embargo, las propiedades de los polímeros son distinguibles (Zuluaga, 2013) (Zhou, Shanmugam, Yomano, & Grabar, 2006).

La biotecnológica se ha sobrepuesto sobre las alternativas síntesis química de ácido láctico siendo la fermentación bacteriana el origen del 90% del ácido láctico disponible comercialmente (Serna-Cock & Rodriguez, 2005).

La síntesis biotecnológica de ácido láctico está limitada al microorganismo, su disponibilidad de sustrato en fase sólida o en sistemas de suspensión con mezcla, el pH, la temperatura, las fuentes nutricionales, es sistema de fermentación y la formación de subproductos (Hofvenahl & Hahn-Hagerdal, 2000).

El ácido láctico bacteriano es un producto importante en el proceso de ensilaje porque facilita su acidificación, lo que lleva a la limitación del proceso respiratorio y la actividad enzimática del sustrato vegetal en el silo y la ya mencionada inhibición del crecimiento de bacterias no beneficiosas en este proceso (Contreras, Marsalis, & Lauriault, s/a). El ácido láctico producido por la homofermentación, inhibe los clostridiales, que perjudican el silo por su producción de ácido butírico y el mal olor consecuente (Custodio, Morais, Daniel, & Pauly, 2016).

2.3. Alimentación en ganado

En el sector pecuario, la nutrición es uno de los aspectos más delicados, por su impacto productivo y económico. Los planes nutricionales, por tanto, son específicos de especie. Para el ganado bovino la producción de leche y cárnicos tiene enfoques nutricionales distintos, que se relacionan de forma adicional con los niveles reproductivos que alcanza cada animal en el hato (DEPROSUR, 2017).

Entre el 70 y 80% de la materia seca del alimento de los rumiantes es metabolizado para obtener la energía que estos requieren para los distintos procesos metabólicos (Villa, 2008). El rumen bovino puede definirse por la complejidad bioquímica de los distintos procesos de digestión de carbohidratos, lípidos y proteínas

que son suministrados en la ingesta de alimentos con niveles altos de materia seca (Galindo, Muñoz, Marrero, Gonzalez, & Sosa, 2017). La producción de leche está altamente ligada a la obtención de energía proveniente de los suplementos nutricionales que el animal ingiere (Guerrero, Sumba, & Salvador, 2014) (Villa, 2008).

En el campo, la nutrición de los bovinos se complementa con balanceados, sales, melaza, restos de cultivo de banano, almidones y otros, estos suplementos impactan positivamente en la nutrición del animal, pero su manejo debe ser controlado para no alterar el equilibrio microbiano del rumen que se caracteriza por su fragilidad (Loján, 2017). Además, es importante establecer el costo-efectividad de la administración de suplementos nutricionales. Los productores lecheros suelen enfrentar pérdidas de los forrajes por la degradación de estos. Los suplementos nutricionales, por tanto, reducen de manera importante la rentabilidad de su producción (DEPROSUR, 2017).

La calidad nutritiva del forraje, con un consumo provechoso en concentración y digestibilidad de la materia seca garantizado en el animal, da lugar a una productividad lechera beneficiosa (Villa, 2008). Ejemplos de forrajes de alto valor nutritivo son el maíz, la avena, el sorgo, la alfalfa, entre otros (Cobos, 2007).

Los forrajes conservados como: el ensilaje, heno o henolaje, facilitan la accesibilidad a productos de valor nutritivo inalterable al hato ganadero durante todo el año. La fermentación anaerobia o ensilaje proporciona fuentes de alimento que disminuye la administración de suplementos alimenticios, con el consecuente el rendimiento productivo del animal (Villa, 2008).

2.3.1. Ensilaje

La fermentación anaerobia de forrajes, mejor conocida como ensilaje, como se ha mencionado previamente, garantiza la preservación de forrajes, con humedad entre el 60 y 70% y sin pérdida significativa del valor nutricional (Cobos, 2007).

Los carbohidratos hidrosolubles del forraje son el sustrato metabolizable presente en los forrajes y que pueden estar fácilmente disponibles para las BAL, después de la trituración, compactación y, eliminación de oxígeno de la materia prima (Cobos, 2007) (Garces Molina, Berrio Roa, Ruiz Alzate, Serna de León, & Builes Arango, 2008).

La disminución mecánica del oxígeno disponible garantiza el proceso, sin embargo, el oxígeno remanente es importante para cumplir la primera fase del proceso de fermentación que ocurre en aerobiosis y que debe limitarse en el tiempo (Cobos, 2007).

La limitación de la fase aerobia evita la proliferación de levaduras o bacterias productoras de alcoholes a partir de la biomasa disponible. Por otro lado, la trituración del material con una granulometría no mayor a los 2 centímetros de diámetro/espesor mejora la biodisponibilidad de sustratos orgánicos (Kotzamanidis, Roukas, & Skaracis, 2002).

La segunda fase del proceso de ensilado, fase anaerobia, se caracteriza por la hidrólisis ácida liderada por las BAL, lo que a su vez tiene importantes efectos sobre la disponibilidad y asimilación facilitada de azúcares, aminoácidos, carbohidratos y sales minerales y nutrientes en el rumen de bovinos (Cobos, 2007).

La bioaumentación en el proceso de ensilado utilizando BAL, ha demostrado ser un factor de mejora en la eficiencia en la preservación del forraje fermentado a la vez que agiliza la acidificación (Parra, 2010) (Zhou, Shanmugam, Yomano, & Grabar, 2006).

Las BAL más utilizadas frecuentemente son las especies homofermentativas como: *Lactococcus lactis*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *Enterococcus faecium* y *Pedicoccus damnosus*. Se destaca *Lactobacillus plantarum* por su metabolismo heterofermentativo facultativo (Diaz, 2014). Las bacterias enlistadas son eficientes metabolizadores de carbohidratos hidrosolubles y grandes productores de ácido láctico. Otras BAL, como *Lactobacillus buchneri* son utilizados por su actividad heterofermentativa que garantiza la inhibición del crecimiento de mohos y levaduras por su capacidad de transformación de carbohidratos a concentraciones elevadas de ácido acético (Parra, 2010).

2.4. Producción de microorganismos a gran escala

2.4.1. Biorreactores

La producción de microorganismos a gran escala ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas de cultivo en sistemas controlados denominados biofermentadores o biorreactores, es aquí donde el cultivo microbiológico es sometido a condiciones optimizadas de nutrientes, temperatura, pH, conductividad, agitación, etc;

que garantizan su propagación. Los niveles de producción dependen del proceso y operación de los biorreactores (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006).

Un biorreactor es un contenedor cerrado, hermético e impermeable, dentro del cual se deposita determinados sustratos que componen el medio de cultivo, y que son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006).

El microorganismo va aumentando en su concentración mientras también se va modificando el medio y se forman productos nuevos de interés industrial, sales, minerales, vitaminas y aminoácidos libres, producto de la fermentación del sustrato, además se producen gases (CO_2) como residuo (CEDECAP, 2007).

Los biorreactores pueden ser de flujo continuo o por lotes, su sistema de alimentación puede regirse por la administración de algún nutriente o elemento adicional si el proceso lo requiere (Ruiz, 2004).

Para la producción de microorganismos BAL se requieren de condiciones anaerobias, fuente de carbohidratos, proteínas, sales minerales y agitación del medio para favorecer a la cinética de crecimiento del microorganismo y obtener una concentración homogénea al interior del biorreactor (Mitchell, Von Meien, & Krieger, 2003).

2.4.1.1. Reactores de flujo continuo

Este tipo de reactores posee un flujo continuo tanto del afluente como del efluente, ya que existe un intercambio de masa durante el tiempo de operación determinado (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006).

De acuerdo con las características del sustrato se predetermina la carga de materia prima que ingresa al reactor y el volumen de lodo removido, con la finalidad de mantener constante el volumen del digestor. En este tipo de operaciones se busca optimizar el proceso llegando a un estado estacionario, mediante el control de parámetros de operación como: temperatura, pH, agitación y concentración del sustrato (Chiriboga, 2010).

Los reactores de flujo continuo son comúnmente utilizados para el tratamiento de aguas residuales donde la carga del material a fermentar y la descarga del efluente se realizan de manera continua o por cortos periodos de tiempo. Son plantas de tratamiento de grandes dimensiones con equipos para la alimentación, calefacción y agitación, requieren de menos mano de obra, pero de una mezcla más fluida o movilizada de manera mecánica. Además requieren de un depósito de gas (CEDECAP, 2007).

Uno de los problemas que conlleva la utilización de este tipo de reactores es la pérdida de microorganismos cuando los caudales de los efluentes son muy altos, quedando al interior del reactor una concentración baja de microorganismos, lo que acarrea dificultades en el proceso; debido a estos inconvenientes, existen también

algunas alternativas de solución operativa que han resultados eficientes (Chiriboga, 2010).

2.4.1.2. Digestor de mezcla completa

El reactor de mezcla completa o CSTR (continuos stirred tank reactor), mantiene la concentración de los microorganismos y del sustrato uniforme mediante la agitación mecánica o sistemas de recirculación, esta agitación debe ser moderada para evitar la lisis de las bacterias (IDEA, 2007).

Los reactores CSTR pueden funcionar mediante un régimen continuo o semi-continuo, esto quiere decir que la alimentación y la descarga son periódicas, siendo este sistema uno de los más utilizados en la propagación de microorganismos (IDEA, 2007), la productividad de estos reactores incrementa con la automatización de los controles de temperatura, agitación y pH, permitiendo manipularlos dentro de los rangos óptimos de operación (Chiriboga, 2010).

2.4.1.3. Reactores de flujo en pistón

En los reactores de flujo en pistón el ingreso del afluente se da por uno de los extremos donde los reactivos y microorganismos son expuestos a distintas condiciones a lo largo del biorreactor (Chiriboga, 2010).

En el transcurso del proceso no hay mezcla completa, debido a esto las concentraciones de bacterias son distintas en cada punto desde el inicio hasta el fin,

siendo una ventaja para poder llevar a cabo diferentes procesos en el mismo reactor, por el contrario, es difícil controlar parámetros como el pH ya que no hay uniformidad en el sistema (Chiriboga, 2010).

2.4.1.4. Reactores de flujo discontinuo

Reactores denominados Batch, son reactores cuya carga inicial corresponde a la máxima capacidad funcional descrita, no existe transferencia de materia, únicamente se extrae el producto al final del proceso digestión (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006).

En este tipo de reactores se requiere incluir en la carga inicial, un inóculo correspondiente a una población bacteriana. El proceso finaliza cuando todo el sustrato es consumido por la biomasa, entendiendo que durante la digestión no existirá carga adicional de materia (Karaj, Rehl, & Muller, 2009).

Esta forma de cultivo es simple y su aplicación puede darse cuando la cantidad de materia orgánica es pequeña y son armados artesanalmente reduciendo los costos de construcción y operación (Karaj, Rehl, & Muller, 2009).

2.4.2. Diseño de biodigestores

Los biodigestores se diseñan tomando en cuenta diferentes parámetros como: la finalidad, materia prima y temperatura con la que se va a trabajar, costos de operación entre otros (CEDECAP, 2007).

En su mayoría los biodigestores son cargados con materia prima fresca y esterilizada, a esta materia inicial se incorpora un inóculo bacteriano, con la finalidad de mantener homogénea la mezcla y evitar formación de biopelículas (Chiriboga, 2010).

Los parámetros de operación más relevantes son:

2.4.2.1. Temperatura

Influye en la degradación de la materia orgánica, regulando la velocidad de crecimiento de las bacterias, existe un rango amplio de operación de un biorreactor que se encuentra entre 10 y 60 °C, lo cual, ha permitido la clasificación de los biodigestores en psicrófilos, mesófilos o termófilos dependiendo si su temperatura de operación se encuentra debajo de los 25 °C, entre los 25 y 45 °C o entre 45 y 60 °C respectivamente (Salamanca, 2009).

Por lo general los biorreactores convencionales trabajan en un rango mesofílico dado que el metabolismo microbiano es más eficiente entre 15 y 35°C, el tiempo de residencia está ligado a la temperatura de crecimiento, a menor tiempo de residencia mayor es la temperatura; con esto se promueve una mayor actividad bacteriana y posteriormente una digestión más eficiente de los sustratos (Chiriboga, 2010).

2.4.2.2. pH

En el proceso natural de propagación de microorganismos productores de ácido láctico mantienen un pH entre 3.5 y 4.5, esto se debe a que dichos microorganismos fermentan los azúcares presentes en el medio cultivo, para su posterior transformación en ácidos orgánicos como son; ácido láctico, propiónico, butírico, acético, etc. (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006).

La población bacteriana presente en el proceso de digestión es susceptible a los cambios drásticos en el pH, si los niveles disminuyen o se incrementan se produce una inhibición en el proceso de fermentación, o en el peor de los casos puede inhibirse completamente (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006). Lo más común es el incremento en la acidez del medio debido a la producción microbiana de ácidos orgánicos (Karaj, Rehl, & Muller, 2009).

2.4.2.3. Relación carbono/nitrógeno

La relación carbono/nitrógeno es un valor numérico que representa la cantidad de carbono requerido como fuente de energía y la de nitrógeno necesario en la síntesis de proteínas, la correcta relación entre estos dos componentes ayudará a que las bacterias descompongan la materia orgánica, ya que consumen treinta veces más rápido el carbono que el nitrógeno (CEDECAP, 2007).

En los sistemas de propagación anaerobia requieren una relación de 30/1 a 35/1 ya que la fuente principal de carbono formará dióxido de carbono, cuando esta relación es muy baja, se perderá el nitrógeno asimilable necesario para actividades celulares, por el contrario, si la relación es alta detendrá el metabolismo ya que hay nitrógeno disponible con lo que el medio se acidifica (Chiriboga, 2010).

2.4.2.4. Agitación

Mediante la agitación del sistema es posible mantener constantes y homogéneos parámetros como: temperatura, pH y concentración de sustratos (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006).

La agitación ayuda también a la remoción de burbujas de gas generadas por las bacterias, mejorando la biodisponibilidad del sustrato nuevo a la población bacteriana existente en el digestor, evitando la formación de costras o biopelículas en la superficie de la biomasa y la generación de espacios sin actividad al interior del reactor (Moncayo, 2008).

Los agitadores mecánicos pueden diseñarse en base a la utilización de paletas, hélices, anclas, tornillos helicoidales o canaletes que se instalan dentro del reactor, el diseño final de los agitadores puede ser:

- Agitadores verticales: Este tipo de estructuras se las aplica en reactores de estructura de acero, el mismo es impulsado por un motor que se encuentra en el exterior del reactor, el diseño de las aspas debe ser aerodinámico para obtener una mezcla adecuada (Salamanca, 2009).

- Agitadores horizontales: Se pueden instalar en biorreactores de acero o plásticos con motores sumergibles o instalados exteriormente (Salamanca, 2009). Las dimensiones del agitador dependen del tamaño del reactor para optimizar la mezcla, las velocidades de agitación pueden llegar a 60 revoluciones por minuto (r.p.m.) con un tiempo de operación de un minuto de acuerdo con el tipo de biomasa (Salamanca, 2009).
- Agitadores Neumáticos: Emplea el gas generado en la fermentación anaerobia o la mezcla líquida del interior del reactor para su recirculación, empleando bombas para la generación de un flujo turbulento al interior del reactor, promoviendo una mayor generación de gas y una rápida estabilización de la biomasa (Salamanca, 2009).

2.5. Comercialización y/o marketing

En términos generales, marketing es un proceso social y administrativo mediante el cual un mercado meta, llamado también clientes o consumidores, obtienen lo que necesitan y desean a través de la creación y el intercambio de productos (Guadalupe, 2013).

Por lo tanto, definimos marketing como un proceso mediante el cual una empresa o negocio crean valor para los clientes, mejor que los competidores, y establecen relaciones sólidas con ellos obteniendo a cambio el valor de los clientes (Kotler & Armstrong, 2008).

2.5.1. Tipos de marketing

Existen varios tipos de Marketing, siendo el más popular el Marketing Comercial, aunque para este estudio se han considerado otros tipos de Marketing que podrían ser de mucha utilidad:

Marketing Social: es el diseño, implementación y control de programas dirigidos a incitar la aceptación de ideas sociales, mediante la inclusión de factores como la planeación del producto, precio, comunicación, distribución e investigación de mercados. Implica el cambio de actitudes, creencias y comportamiento de los individuos y las organizaciones en beneficio de la sociedad. La transformación social debe ser el propósito fundamental de toda campaña de esta índole (Pérez L. , 2004).

Geomarketing o Marketing Territorial: está orientado hacia el conocimiento global del cliente, sus necesidades y comportamientos dentro de un entorno geográfico determinado, otorga una visión más completa del mismo e identifica sus necesidades (Pérez, Calero, & Hernández, 2012).

2.5.2. Análisis de marketing

2.5.2.1. Análisis interno:

Para tener una visión clara de la situación en la que se desarrollarán las actividades del marketing se debe realizar un análisis completo de aspectos importantes que lo afectarán dentro de la organización:

- **Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas:**

La dirección de la función del marketing inicia con un análisis completo de la situación de la empresa. El mercadólogo debe realizar un análisis FODA, el cual genera una evaluación global de las fortalezas (F), oportunidades (O), debilidades (D), y amenazas (A) de la empresa.

Las fortalezas incluyen capacidades internas, recursos, y factores circunstanciales positivos que pueden ayudar a la compañía a atender a sus clientes y alcanzar sus objetivos (Kotler & Armstrong, 2008).

Las debilidades comprenden limitaciones internas y factores circunstanciales negativos que pueden interferir con el desempeño de la empresa (Kotler & Armstrong, 2008).

Las oportunidades son factores favorables o tendencias presentes en el entorno externo que la compañía puede explotar y aprovechar (Kotler & Armstrong, 2008).

Las amenazas son factores externos desfavorables o tendencias que pueden producir desafíos en el desempeño (Kotler & Armstrong, 2008).

El análisis del mercado y su entorno facilita la visualización de oportunidades atractivas y la identificación de amenazas externas que pueden ser evitadas; la empresa debe estudiar sus fuerzas y debilidades, así como sus acciones de marketing actuales y potenciales, para determinar cuáles oportunidades pueden ser mejor aprovechadas.

La meta es empatar las fortalezas de la compañía con oportunidades atractivas del entorno, eliminando o reduciendo así las debilidades y minimizando las amenazas (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

- **Revisión de objetivos, estrategia y desempeño actual:**

Es necesario que los objetivos, la estrategia y el desempeño de marketing de la empresa tengan una evaluación periódica para garantizar su apego con la misión de la compañía, el cambiante ambiente externo y el compromiso con los clientes y sus necesidades. También será necesario evaluar el desempeño de la estrategia de marketing que la empresa sostiene en relación con el volumen de ventas, la participación en el mercado, la productividad y otras medidas relevantes (Lamb, Hair, & McDaniel, 2002).

El desempeño deficiente o en declive puede ser el resultado de un manejo equivocado de metas u objetivos de marketing inconsistentes con la dinámica del ambiente externo o los clientes. Los cambios en los ambientes externos y las

crecientes exigencias de los clientes están fuera del control de la empresa, pero deben ser constantemente evaluados (Ferrell & Hartline, 2006).

- **Disponibilidad de los Recursos:**

Se deberán revisar los niveles actuales y anticipados de los recursos de la organización que se pueden utilizar para propósitos de marketing, esta revisión incluye un análisis de los recursos financieros, humanos y de experiencia, así como de cualquier recurso del cual la empresa pueda disponer y que genere impacto en las relaciones clave con sus socios de la cadena de abastecimiento, los socios de alianzas estratégicas o grupos de clientes (Kotler & Armstrong, 2008).

Un elemento importante de este análisis es medir la probabilidad de que la disponibilidad o el nivel de estos recursos cambien en un futuro cercano. Es posible utilizar recursos adicionales para crear ventajas competitivas y cubrir así las necesidades de los clientes (Ferrell & Hartline, 2006).

- **Estructura Organizacional:**

Se deben revisar los aspectos culturales y estructurales actuales y anticipados que podrán afectar las actividades de marketing; uno de los aspectos más importantes de esta revisión comprende la cultura interna de la empresa ya que de esta manera se podrá determinar cuál es la posición jerárquica del marketing dentro de la organización que influirá en la cantidad de recursos que se asignen a esta área (Guadalupe, 2013).

Además, la cultura interna incluye cualquier cambio anticipado en los puestos ejecutivos clave de la empresa, así como en la orientación general de la misma hacia el cliente y el compromiso de los empleados con la organización (Ferrell & Hartline, 2006). Para la mayor parte de las empresas, la cultura y la estructura son aspectos relativamente estables que no cambian mucho de un año a otro; sin embargo, en algunos casos, pueden cambiar de repente, provocando luchas políticas y de poder dentro de la organización (Ferrell & Hartline, 2006).

2.5.2.2. Análisis externo

Es de vital importancia llevar a cabo un análisis que permita conocer los aspectos relevantes de las fuerzas externas que afectan a la empresa. Estos aspectos están contenidos dentro de un micro y macroentorno (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

2.5.2.2.1. Microentorno:

El éxito del marketing se basa en la creación de relaciones entre departamentos de la compañía, proveedores, intermediarios de marketing, clientes, competidores, los cuales se combinan para formar la red de entrega de valor de la empresa (Kotler & Armstrong, 2008).

Proveedores: proporcionan los recursos que la empresa necesita para producir sus bienes y servicios. Problemas con los proveedores pueden afectar seriamente al marketing (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

Intermediarios de marketing: ayudan a la empresa a promover, vender y distribuir sus productos a los compradores finales; incluyen distribuidores, empresas de distribución física, agencias de servicios de marketing, e intermediarios financieros. Los distribuidores son empresas de canal de distribución que ayudan a la compañía a encontrar clientes o venden a los clientes (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

Clientes: La compañía necesita estudiar de cerca los cinco tipos de mercados de clientes. Los mercados de consumo consisten en individuos y hogares que compran bienes y servicios de consumo personal. Los mercados industriales compran bienes y servicios para procesarlos o usarlos en su proceso de producción, mientras que los mercados de distribuidores compran bienes y servicios para revenderlos y obtener una utilidad. Los mercados gubernamentales están formados por dependencias del gobierno que adquieren bienes y servicios para producir servicios públicos o transferirlos a quienes los necesitan. Por último, los mercados internacionales comprenden todos los tipos de compradores mencionados pero ubicados en distintos países, e incluyen consumidores, productores, distribuidores y gobiernos (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

Competidores: una empresa debe proporcionar a sus clientes mayor valor y satisfacción que los competidores. Por lo tanto, se debe obtener ventaja estratégica

mediante el posicionamiento vigoroso de su oferta en la mente de los consumidores en comparación con las ofertas de la competencia (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

Instituciones financieras: influyen en la capacidad de la empresa para obtener fondos. Bancos, casas de inversión y accionistas son los principales públicos financieros (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

Medios de comunicación: llevan noticias, artículos y opinión editorial; incluyen diarios, revistas y estaciones de radio y televisión (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

Gobierno: La dirección debe tener en cuenta lo que hace el gobierno. El mercadólogo a menudo tiene que consultar a los abogados de la empresa con respecto a cuestiones como la seguridad de los productos, publicidad veraz, y otros asuntos (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

2.5.2.2.2. Macroentorno

La empresa y todos los demás actores operan en un macroentorno más amplio, el cual, molde las oportunidades y presentan riesgos para la empresa, entre las cuales tenemos:

Entorno demográfico: estudia las poblaciones humanas en términos de tamaño, densidad, ubicación, edad, sexo, raza, ocupación y otros datos estadísticos, resulta de gran interés para el mercadólogo porque se refiere a las personas, y las personas constituyen los mercados (Pérez, Calero, & Hernández, 2012).

Fuerzas económicas: divide al mercado de acuerdo a los ingresos monetarios de la población, es decir, en consumidores de clase alta, media y baja (Pérez L. , 2004).

Fuerzas naturales: abarca los recursos naturales que se requieren como insumos o que resultan afectados por las actividades de la empresa, el interés ecológico ha aumentado constantemente durante las últimas tres décadas (Kotler & Armstrong, 2008).

Fuerzas tecnológicas: es una de las fuerzas que está cambiando más drásticamente al marketing, la tecnología ha producido maravillas tales como antibióticos, trasplantes de órganos, aparatos electrónicos en miniatura, computadoras portátiles, internet y demás (Kotler & Armstrong, 2008).

Fuerzas políticas: Los sucesos que tienen lugar en el entorno político afectan marcadamente las decisiones de marketing. Las leyes y dependencias generadas por el gobierno y grupos de presión influyen en la sociedad a nivel organizacional, personal y los limitan (Kotler & Armstrong, 2008).

Fuerzas culturales: se compone de instituciones y otras fuerzas que afectan valores, percepciones, preferencias, y comportamientos básicos de una sociedad (Kotler & Armstrong, 2008).

2.5.3. Segmentación de mercados

La segmentación de mercados es una herramienta que nos permite identificar al mercado al que nos dirigiremos, como mencionan Kotler y Armstron (2008).

Mediante la segmentación de mercados, se puede dividir mercados grandes en segmentos más pequeños a los que se puede llegar de manera eficaz con productos y servicios adaptados a sus necesidades (Fernández, 2007).

La segmentación de mercados trae grandes beneficios a las empresas, en el caso de una organización pequeña, que posee pocos recursos y carece de posicionamiento, se le facilitará la forma de penetrar eficazmente en el mercado, debido a que enfocarán sus actividades de marketing a un fragmento objetivo de la población, compitiendo de manera exitosa y utilizando de forma más eficiente sus recursos (Guadalupe, 2013).

Aunque no existe una manera estándar para segmentar un mercado, sin embargo, se pueden probar diferentes variables, entre ellas tenemos:

La segmentación geográfica requiere dividir un mercado en base a unidades geográficas o de ubicación, como: naciones, regiones, estados, municipios, ciudades, o incluso vecindarios (Kotler & Armstrong, 2008).

La segmentación demográfica divide al mercado en grupos con base en variables demográficas como edad, sexo, tamaño de familia, ciclo de vida familiar, ingreso, ocupación, educación, religión, raza, y nacionalidad. Los factores demográficos son las bases más utilizadas para segmentar a grupos de clientes, en

parte porque las necesidades, los deseos y la frecuencia de uso de los consumidores a menudo varían de acuerdo con las variables demográficas (Pérez, Calero, & Hernández, 2012).

La segmentación psicográfica divide a los compradores en diferentes grupos con base en su clase social, estilo de vida, o características de personalidad. Los miembros de un mismo grupo demográfico pueden tener características psicográficas muy diversas (Guadalupe, 2013).

La segmentación conductual divide a los compradores en grupos con base en sus conocimientos, actitudes, usos o respuestas a un producto. Muchos mercadólogos piensan que las variables de la conducta son el mejor punto de partida para formar segmentos de mercado (Kotler & Armstrong, 2008).

Después que una empresa ha definido segmentos de mercado, puede ingresar a uno o varios segmentos de un mercado específico. La determinación del mercado meta implica evaluar qué tan atractivo es cada segmento de mercado y seleccionar el o los segmentos a que se ingresará. Las empresas deben enfocarse hacia segmentos donde puedan generar el mayor valor posible para el cliente de manera rentable y sostenerlo a través del tiempo (Kotler & Armstrong, 2008).

2.5.4. Mezcla de marketing

Para lograr la consecución de los objetivos organizacionales a través del Marketing, es importante considerar uno de sus pilares fundamentales: el Marketing Mix o Mezcla de Marketing.

El marketing mix es la combinación de un producto, su distribución, promoción y precio. Juntos, estos cuatro componentes de la estrategia deben satisfacer las necesidades del mercado meta y, al propio tiempo, lograr los objetivos de la organización (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

La mezcla de marketing es el conjunto de herramientas de marketing tácticas y controlables que la empresa combina para producir la respuesta deseada en el mercado meta. La mezcla de marketing incluye todo lo que la empresa puede hacer para influir en la demanda de su producto (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

Las muchas posibilidades pueden reunirse en cuatro grupos de variables conocidas como las “cuatro P”: producto, precio, plaza y promoción. Un programa de marketing eficaz fusiona todos estos elementos en un programa coordinado y diseñado para alcanzar los objetivos de marketing de la empresa al entregar valor a los consumidores (Kotler & Armstrong, 2008).

Cada uno de los elementos que conforman la mezcla de marketing deben ser estudiados por separado, esto debido a su extensión y relevancia.

2.5.4.1. Producto

Se define como producto a todo aquello, sea favorable o desfavorable, que una persona recibe en un intercambio (Lerma, 2010).

Un producto puede ser un bien tangible como un par de zapatos; un servicio, como un corte de pelo; una idea, como “no tire basura”; o una combinación de las tres con el objetivo final de satisfacer una necesidad determinada (Lerma, 2010).

Empaque, estilo, color, opciones y tamaños son algunas características típicas del producto tangible. Los intangibles, como el servicio, la imagen del vendedor, la reputación del fabricante y la forma en que los consumidores creen que otras personas verán el producto, tienen la misma importancia (Lamb, Hair, & McDaniel, 2002).

2.5.4.1.1. Estrategias de Producto

- **Desarrollo de productos:**

Cada día vemos en el mercado miles de nuevos productos, creados para satisfacer las diversas necesidades de los consumidores, pero detrás de un producto hay un proceso más extenso de lo que parece.

El desarrollo de un producto es el conjunto de acciones que tienen como fin la creación de nuevos satisfactores y/o la actualización, cambio o mejoramiento de satisfactores existentes, con el fin de comercializarlos tanto para obtener satisfacción

de las necesidades o deseos de los consumidores como para generar ingresos para que las empresas puedan operar, actualizarse y crecer (Lerma, 2010).

Las empresas pueden aplicar una o varias formas para crear nuevos productos; a continuación, algunas de ellas:

Desarrollo de productos en forma interna: con la utilización de recursos propios, esencialmente se refiere a que las personas encargadas del desarrollo sean trabajadores de la misma empresa (Lerma, 2010).

Desarrollo de productos en forma externa: subcontratando para este trabajo a terceros, como pueden ser algunos centros de investigación tecnológica, universidades y despachos especializados, etc. (Lerma, 2010).

Desarrollo de productos en forma combinada: tanto con recursos de la empresa, como con recursos de las organizaciones que subcontraten (Lerma, 2010).

Compra de patentes: de nuevos productos a otras organizaciones (Lerma, 2010).

Actualización de productos: de línea que se encuentren en etapa de declive, utilizando recursos internos o la subcontratación de terceros (Lerma, 2010).

- **Proceso de desarrollo de nuevos productos:**

El proceso de creación de nuevos productos parte desde el nacimiento de la idea hasta la consolidación de esta, mediante la entrada del producto al mercado. Hay varios pasos que se deben seguir:

Generación de ideas: las ideas de nuevos productos provienen de muchas fuentes, siendo la primera los clientes, ya que son ellos a quienes se busca satisfacer.

La segunda fuente son los empleados, sobre todo los vendedores, ya que son quienes analizan y participan constantemente en el mercado. La tercera fuente son los distribuidores ya que están en contacto permanente con el cliente y saben cuáles son las necesidades que no están siendo satisfechas; los competidores también son importantes para este fin ya que tenemos un modelo a seguir (si les va bien) o un ejemplo de lo que no se debe hacer en el mercado (si les va mal) (Lamb, Hair, & McDaniel, 2002).

Filtración de ideas: después de que se generaron nuevas ideas, estas pasan a través del primer filtro. En esta etapa se eliminan las ideas no consistentes con la estrategia de nuevos productos de la empresa o que resultan inapropiadas por alguna otra razón. Un grupo de desarrollo formal realiza el proceso de filtración (Lerma, 2010).

Análisis de negocios: las ideas de nuevos productos que sobreviven al filtrado inicial pasan a esta etapa en donde se calculan cifras preliminares de demanda, costos, ventas y rentabilidad. Por primera vez se estiman y comparan costos e ingresos.

Lo novedoso del producto, el tamaño del mercado y la naturaleza de la competencia, son todos factores que afectan a la precisión de las proyecciones de los ingresos. El análisis de las tendencias económicas globales y su influencia en las ventas estimuladas es algo especialmente importante en categorías de productos sensibles a fluctuaciones (Lerma, 2010).

Desarrollo: en la primera etapa del desarrollo, el departamento de ingeniería tiene la opción de diseñar un prototipo de producto. Se empieza a crear la estrategia

de marketing y la empresa decide el empaque del producto, la marca, las etiquetas y otras cosas por el estilo. Además, hay que diseñar estrategias preliminares de promoción, precio y distribución. La etapa de desarrollo quizá exija un largo período por lo cual llega a ser muy costosa (Lerma, 2010).

Pruebas de mercado: una vez desarrollados los productos y los programas de marketing, por lo general, son aprobados por el mercado. Las pruebas son la introducción limitada de un producto y un programa de marketing para determinar las reacciones de clientes potenciales en una situación real de mercado. Las pruebas de mercado permiten a los administradores evaluar estrategias alternativas y determinar cuán bien se integran los diversos aspectos de la mezcla del marketing (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

- **Desarrollo de marcas:**

Para que un producto sea reconocido y diferenciado de la competencia es necesario llevar a cabo el desarrollo de la marca, tomando en cuenta algunos parámetros que nos da conocer el autor Alejandro Moncalvo (2007) en el siguiente contenido:

El desarrollo de marcas es la integración de acciones comunicacionales y de marketing que realiza la empresa desde su esencia, luego de haber analizado cada uno de los componentes con los que planificará el “nombre de marca”. A la hora de analizar o planificar el desarrollo de una marca se deben tener en cuenta todos sus componentes: éstos deben ser analizados individualmente e integrados a la

estrategia de marca, para poder utilizárselos correctamente en el plan de marketing (Moncalvo, 2007).

El objetivo es medir, identificar y reconocer las curvas de crecimientos, la imagen e identidad, el nivel de satisfacción del cliente, las cualidades y efectividad de la fidelización del cliente, etc. El desarrollo de una marca comienza con la intención de los emprendedores y las acciones necesarias para lograrlo atañen a toda la empresa y en todas sus etapas, estas son (Moncalvo, 2007):

- Saber lo que se quiere comunicar.
- Identificar el modo de aproximarnos al receptor, lograr la percepción que queremos que él tenga de nosotros.
- Evaluar el tipo de reconocimiento que el consumidor hará sobre nuestras tareas y beneficios.

2.5.4.2. Precio

El precio es el dinero intercambiado por un producto, es lo que se entrega a cambio para obtener dicho producto (Lamb, Hair, & McDaniel, 2002).

El precio representa la única variable de la mezcla de mercadotecnia que genera ingresos para la empresa, el resto solo crea egresos. Sus variables son precio de lista, descuentos, complementos, periodos de pago y condiciones de crédito (Kotler & Armstrong, 2008).

2.5.4.2.1. Estrategias de Precios

- **Fijación de precios para nuevos productos:**

Para determinar el precio de un nuevo producto que, a la vez sea atractivo para el cliente y resulte conveniente para la empresa, es necesario tomar en cuenta lo mencionado por Kotler y Armstrong (2008) a continuación:

Las estrategias de fijación de precios normalmente cambian conforme el producto atraviesa por su ciclo de vida, por ejemplo, la etapa de introducción suele ser la más difícil; las compañías que sacan un producto nuevo enfrentan el reto de fijar los precios por primera vez, y pueden elegir entre dos amplias estrategias: fijación de precios por descremado y fijación de precios para penetrar en el mercado.

Fijación de precios por descremado. Muchas compañías que inventan productos nuevos inicialmente establecen precios altos para “descremar” las ganancias capa por capa del mercado. La descremación de las capas superiores del mercado sólo tiene sentido en ciertas condiciones. En primer lugar, la calidad y la imagen del producto deben sostener su precio más alto, y la cantidad de compradores que quieren el producto a ese precio debe ser suficiente. Segunda condición: los costos de producir un volumen más pequeño no deben ser tan altos que cancelen la ventaja de cobrar más. Por último, los competidores no deben poder entrar fácilmente en el mercado para socavar el precio elevado (Kotler & Armstrong, 2008).

Fijación de precios para penetrar en el mercado. En lugar de fijar un precio inicial alto para dividir en capas segmentos del mercado pequeños pero rentables, algunas compañías utilizan la fijación de precios para penetrar en el mercado. Fijan un precio bajo inicial con el fin de penetrar en el mercado de manera rápida y profunda. El elevado volumen de ventas hace que los costos bajen, y esto permite a la compañía bajar sus precios todavía más (Walker, Boyd, Mullins, & Larréché, 2005).

2.5.4.3. Plaza

También conocido como Distribución o Canales de Marketing, en donde se incluye todas las actividades de la empresa que pone al producto en disposición del mercado meta. Es una estructura de negocios de organizaciones interdependientes que va desde el punto de origen del producto hasta el consumidor, con el propósito de llevar los productos a su destino final de consumo (Lerma, 2010).

Un punto importante que tomar en cuenta es la manera cómo se realizará la distribución del producto. Las compañías pueden diseñar sus canales de distribución para proporcionar productos y servicios a los clientes en diferentes maneras. Cada capa de intermediarios de marketing que realiza alguna función para acercar el producto y su posesión al comprador final constituye un nivel de canal. El número de niveles de intermediarios indica la longitud de un canal como se muestra en la figura 3. El canal 1, llamado canal de marketing directo no tiene niveles de intermediarios,

los demás canales son indirectos, y contienen uno o más intermediarios (Kotler & Armstrong, 2008).

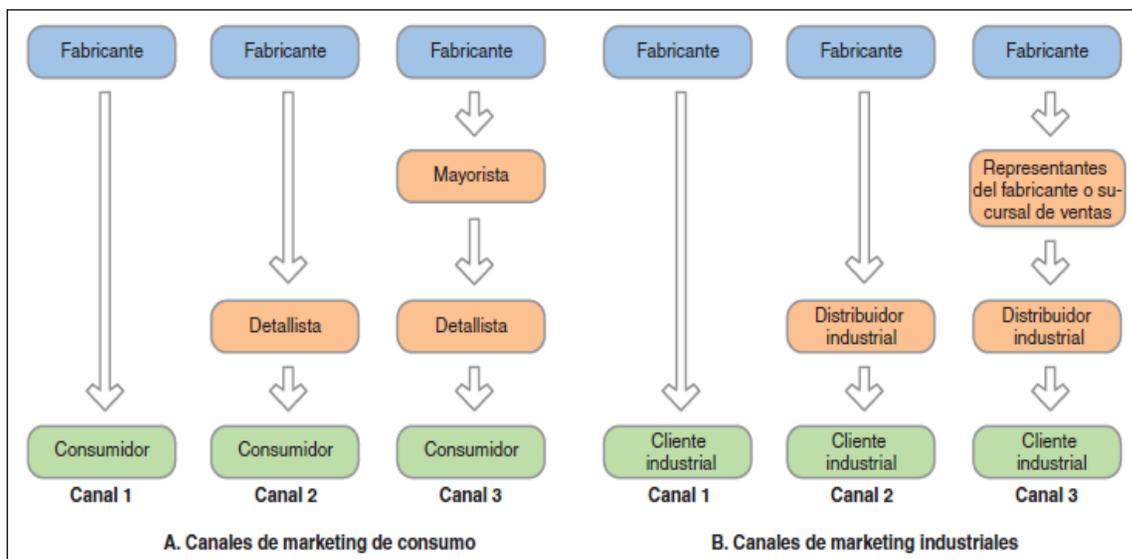


Figura 3. Canales de Marketing de consumo e industriales.

Fuente: (Kotler & Armstrong, 2008).

2.5.4.3.1. Estrategias de Distribución

Una estrategia de distribución adecuada es esencial para el éxito de una empresa gracias a que su producto llegará de manera oportuna al cliente. Existen tres estrategias básicas para la distribución:

Distribución Exclusiva: es el tipo de cobertura de mercado más restringida. Las empresas que utilizan esta estrategia dan a un comerciante o a una tienda el derecho único de vender un producto en una región geográfica definida. Esta estructura de canal es la que con mayor frecuencia se relaciona con los productos de prestigio, el

equipo industrial más importante o con empresas que tratan de dar a sus productos una imagen exclusiva o de prestigio (Ferrell & Hartline, 2006).

Distribución Selectiva: consiste en dar a varios comerciantes o tiendas el derecho de vender un producto en un área geográfica definida. Es recomendable cuando los clientes necesitan tener la oportunidad de comparar en el momento de comprar, y cuando el servicio posterior a la venta es importante (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

Distribución Intensiva: Este tipo de distribución hace que el producto esté disponible en el máximo número de tiendas en cada área a fin de obtener la mayor exposición y la mayor oportunidad de ventas posibles (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

2.5.4.4. Promoción

El cuarto y último elemento básico en la mezcla de marketing es la Promoción, la cual abarca una serie de actividades cuyo objetivo es informar, persuadir y recordar a los compradores potenciales de un producto con objeto de influir en su opinión u obtener una respuesta (Lamb, Hair, & McDaniel, 2002).

Sus variables son: publicidad, venta personal, promoción de ventas, relaciones públicas, telemarketing y propaganda (Kotler & Armstrong, 2008).

2.5.4.4.1. La mezcla de Promoción

Un aspecto relevante por tomar en cuenta es la forma en la cual se va a dar a conocer al cliente tanto la existencia del producto, así como sus características y beneficios.

Toda la mezcla de promoción de una compañía, también llamada mezcla de comunicaciones de marketing consiste en la combinación de las herramientas específicas de publicidad, promoción de ventas, relaciones públicas, ventas personales, y marketing directo que la compañía utiliza para comunicar de manera persuasiva el valor a los clientes y crear relaciones con ellos (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

He aquí definiciones de las cinco principales herramientas de promoción:

Publicidad: Cualquier forma pagada de presentación y promoción no personal de ideas, bienes, o servicios por un patrocinador identificado. Incluye transmisiones por radio o televisión, medios impresos, internet, anuncios en exteriores, y otros recursos (Kotler & Armstrong, 2008).

Promoción de ventas: Incentivos a corto plazo que fomentan la compra o venta de un producto o servicio. Incluye descuentos, cupones, exhibidores en punto de compra, y demostraciones (Ferrell & Hartline, 2006).

Relaciones públicas: Crear buenas relaciones con los diversos públicos de una compañía mediante la obtención de publicidad favorable, la creación de una buena imagen corporativa, y el manejo o bloqueo de rumores, anécdotas, o sucesos

desfavorables. Incluyen el desarrollo de boletines de prensa, patrocinios, eventos especiales, y páginas web (Ferrell & Hartline, 2006).

Ventas personales: Presentación personal que realiza la fuerza de ventas de la compañía con el fin de efectuar una venta y crear relaciones directas con los clientes (Guadalupe, 2013).

Marketing directo: Comunicación directa con los consumidores individuales, seleccionados cuidadosamente, con el fin de obtener una respuesta inmediata y crear relaciones duraderas con ellos mediante el uso del teléfono, correo, fax, correo electrónico, internet, y de otras herramientas para comunicarse directamente con consumidores específicos. Incluye la creación de catálogos, telemarketing, kioscos, internet, entre otros (Kotler & Armstrong, 2008).

En sí, la comunicación va más allá de estas herramientas de promoción específicas. El diseño del producto, su precio, la forma y el color de su empaque, y las tiendas que lo venden son todas características que comunican algo a los compradores. Así, aunque la mezcla de promoción es la actividad básica de comunicación de la compañía, toda la mezcla de marketing se debe coordinar si se quiere tener el impacto de comunicación más grande posible (Ferrell & Hartline, 2006).

2.5.4.4.2. Estrategias de Promoción

Dentro de las estrategias básicas de promoción tenemos la estrategia de empujar y la estrategia de jalar.

Estrategia de Empujar: es en la que los fabricantes utilizan ventas personales enérgicas y publicidad industrial para convencer a un mayorista o un detallista con el fin de que maneje y venda su mercancía, a su vez, el mayorista con frecuencia debe empujar la mercancía hacia adelante y convencer al detallista a que la maneje. El detallista entonces utiliza la publicidad, exhibiciones y otras formas de promoción para convencer al consumidor a que compre los productos (Lamb, Hair, & McDaniel, 2002).

Estrategia de Jalar: estimula la demanda de consumo para obtener la distribución del producto. En lugar de tratar de vender al mayorista, el fabricante que utiliza la estrategia de jalar enfoca sus esfuerzos de promoción sobre los consumidores finales o líderes de opinión. Una intensa entrega de muestras como publicidad introductoria para el consumidor, campañas de reducción de precio y el uso de cupones forman parte de esta estrategia (Ferrell & Hartline, 2006).

2.5.5. Posicionamiento

El posicionamiento consiste en diseñar la oferta de la empresa de modo que ocupe un lugar claro y apreciado en la mente del mercado meta (Kotler & Armstrong, 2008).

Los consumidores sufren una sobrecarga de información acerca de los productos y servicios; no pueden evaluar nuevamente los productos cada vez que toman una decisión de compra. Para simplificar el proceso de compra, los consumidores organizan los productos por categorías: “posicionan” los productos, los servicios, y empresas en su mente (Stanton, Etzel, & Walker, 2007).

La posición de un producto es el conjunto complejo de percepciones, impresiones y sentimientos que los consumidores tienen respecto al producto, en comparación con los productos de la competencia (Kotler & Armstrong, 2008).

El objetivo del posicionamiento es que cada consumidor objetivo perciba la marca como distinta de las competidoras, con una percepción más favorable de las otras marcas (Ferrell & Hartline, 2006).

2.5.5.1. Proceso de posicionamiento

Para que el posicionamiento sea eficiente tanto para productos nuevos como para productos existentes, se tomará en cuenta una serie de pasos que se aplican a

los bienes y servicios, en los mercados nacionales e internacionales (Walker, Boyd, Mullins, & Larréché, 2005).

Paso 1: Identificar un conjunto relevante de productos competitivos.

En el ámbito de la categoría de producto, el análisis examina las percepciones de los clientes de productos que podrían considerar sustitutos para satisfacer una misma necesidad básica. Una vez que los competidores introducen varias marcas en la categoría, un análisis de posicionamiento en el ámbito de producto o de marca puede ser útil para entender mejor cómo atraen las diversas marcas a los clientes, con el fin de posicionar nuevos productos o marcas planeados o reposicionar productos actuales, así como para identificar dónde se podrían encontrar nuevas oportunidades competitivas.

Los mercadólogos que omiten productos sustitutivos o competidores potenciales corren el riesgo de que una competencia imprevista los vulnere en su lado ciego.

Paso 2: Identificar atributos dominantes

El posicionamiento se puede basar en diversos atributos, algunos en forma de sustitutos que implican características o beneficios deseables como base de posicionamiento. Los tipos más comunes son los siguientes:

- Las características: se consideran a menudo en el posicionamiento físico del producto.
- Los beneficios.

- El uso: comprende el uso final, el demográfico, psicográfico o de comportamiento y de popularidad.
- La paternidad: abarca a quién lo hace y productos con precedencia.
- El proceso de manufactura.
- Los ingredientes o insumos utilizados
- Los resultados.
- La comparación del producto con el de un competidor
- La clase de producto
- El precio y calidad
- El país o área geográfica
- Lo proambiental: trata de presentar a la compañía como “buena ciudadana”.

En teoría, los consumidores pueden considerar muchos atributos para elevar los productos o marcas, pero el número de los que realmente influyen en la elección de un consumidor es pequeño, en parte porque estos pueden tomar en cuenta sólo los atributos que conocen (Fernández, 2007). Cuantas más variables se utilizan en el posicionamiento de un producto determinado, mayor es la oportunidad para la confusión e incluso para la incredulidad por parte del consumidor, por lo tanto el esfuerzo de posicionamiento debe mantenerse lo más sencillo posible y evitar la complejidad (Fernández, 2007).

Paso 3: Reunir datos sobre percepciones de los clientes de productos en el conjunto competitivo

Una vez que se ha identificado el conjunto de productos competentes, es necesario saber qué atributos son determinantes para el mercado objetivo y la categoría de producto en consideración; necesita saber también cómo son vistos los diferentes productos en el cuadro competitivo en cuanto a estos atributos. Por lo regular, este conocimiento de mercado se obtiene llevando a cabo primero una investigación cualitativa, tal vez efectuando entrevistas o consultando con grupos de enfoque. Luego sigue la investigación cuantitativa, acaso con la aplicación de una encuesta a los consumidores con el fin de conocer sus percepciones y así reunir datos acerca de cómo califican o dan puntos a los productos competidores en estos atributos.

Paso 4: Analizar las posiciones actuales de los productos en el conjunto competitivo.

Ya sea que el proceso de posicionamiento se dirija a un nuevo producto no introducido o a reposicionar uno ya situado, es importante desarrollar un claro concepto del posicionamiento de los productos que se ha determinado que están en el conjunto competitivo.

A menudo, el conjunto de conciencia de una determinada clase de producto es de tres o menos marcas, aun cuando el número de marcas disponibles sea mayor a veinte. De tal suerte, la mayoría de las marcas tienen una pequeña posición o ninguna en la mente de muchos consumidores.

Por esto, el primer paso para adquirir una posición definida para una marca es crear conciencia de esta para lo cual es necesario que la marca se asocie fuertemente con uno o más conceptos relacionados con la decisión de compra.

Paso 5: Determinar la combinación de atributos preferida por los clientes

Hay varias formas en que los analistas pueden medir las preferencias del cliente e incluirlas en un análisis de posicionamiento. Por ejemplo, se les puede pedir a los encuestados que piensen en el producto o marca ideal dentro de una categoría de producto: una marca hipotética que posea la combinación perfecta de atributos (desde el punto de vista del cliente).

Los encuestados podrían calificar entonces varios atributos de su producto ideal y de los productos existentes. Un método alternativo es pedirle a los encuestados que además de juzgar el grado de semejanza en pares de marcas existentes, indiquen su grado de preferencia de cada componente del par. En cualquier caso, cuando el analista usa las técnicas estadísticas apropiadas, puede localizar los puntos ideales de los encuestados relativos a las posiciones de las diversas marcas existentes en el mapa de espacio de producto.

Paso 6: Considerar el ajuste de posiciones posibles de acuerdo con las necesidades del cliente y el atractivo del segmento

Un criterio importante para definir los segmentos de mercado es la diferencia de los beneficios que buscan los distintos clientes. Debido a que las diferencias entre los puntos ideales de los clientes reflejan variaciones en los beneficios que buscan, el

análisis de posicionamiento de mercado, así como las posiciones percibidas de las diferentes marcas. Cuando los puntos ideales de los clientes se aglomeran en dos o más ubicaciones en el mapa de espacio de producto, el analista puede considerar cada aglomeración o agrupamiento como un segmento de mercado distinto.

Paso 7: Redactar la declaración de posicionamiento o proposición de valor para guiar el desarrollo de la estrategia de marketing.

La decisión final acerca de dónde se ha de posicionar una nueva marca debe basarse tanto en el análisis de asignación de objetivos de mercado, como en los resultados de un análisis de posicionamiento de mercado. La posición escogida debe coincidir con las preferencias de un segmento de mercado particular y tomar en cuenta las posiciones actuales de las marcas competidoras; además, debe reflejar el atractivo actual y futuro del mercado objetivo, así como las fortalezas y debilidades relativas de los competidores. Esta información junto con el análisis de los costos que se requiere cubrir para adquirir y mantener estas posiciones permite evaluar las implicaciones económicas de las diferentes estrategias de posicionamiento de mercado.

Una vez que se ha determinado el posicionamiento deseado para el producto, es buena idea ponerlo por escrito para que los encargados de crear y ejecutar la estrategia de marketing entiendan con claridad cómo se pretende colocar el producto y dónde encajará este en su conjunto competitivo. Para hacer esto se aplican comúnmente dos métodos. En el método clásico se redacta una “declaración de

posicionamiento”, mientras que un método más reciente consiste en redactar una “proposición de valor” para el producto.

Declaración de posicionamiento: es un escrito en el que se identifica el mercado objetivo para el cual se está planeando el producto, así como la categoría de producto en la que éste compite y se declara el beneficio singular que ofrece.

Proposición de valor: es de igual modo explícita acerca de lo que el producto hace (y a veces de lo que no hace) dirigida al cliente, y por lo regular incluye también información acerca de la asignación de precios respecto de los competidores.

Ambos métodos deben reflejar una proposición de venta única a la que el producto da cuerpo; en este sentido, ambas reflejan la base sobre la cual el mercadólogo intenta obtener una ventaja competitiva sostenible, diferenciando el producto de otros en su espacio competitivo (Walker, Boyd, Mullins, & Larréché, 2005).

2.6. Hipótesis

El consorcio definido a partir de bacterias ácido-lácticas nativas aisladas es un bioinoculante demandado por su eficiencia en los procesos de fermentación y conservación de forrajes.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica de la investigación

El presente trabajo de investigación se ejecutó en las instalaciones del laboratorio de microbiología agrícola de la empresa BIOAGROPEC, ubicado en la parroquia San Pedro de Taboada, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, 0° 18,36 S; 78° 27,33 E; altitud 2516 msnm., y su desarrollo tiene impacto directo sobre el sector agrícola, pecuario e industrial dado que ofrece soluciones factibles y sustentables con productos y procesos biotecnológicos para la mejora del proceso de fermentación y conservación de forrajes utilizados como alimento en el ganado bovino con la consecuente mejora en rendimiento y producción.

3.2. Obtención de forrajes

A partir de un diseño completamente al azar se obtuvo muestras de tres tipos de forrajes: maíz, avena y cebada (20 Kg cada una) de diferentes haciendas ganaderas del cantón Mejía.

El material por fermentar se transportó al laboratorio de BIOAGROPEC. Los forrajes fueron picados en partículas de 1 a 2 cm; el material picado fue compactado y cubierto para excluir el aire (figura 4).



Figura 4. Recolección, transporte y picado de la materia vegetal.

Se simuló el proceso de ensilaje en tubos de PVC de 6 pulgadas de diámetro. Se mantuvo la fermentación del material durante 21 días, en ambiente anaeróbico para facilitar el desarrollo de bacterias que acidifican el forraje para el posterior análisis microbiológico e identificación de BAL (figura 5).



Figura 5. Simulación de proceso de ensilaje en tubo de PVC.

3.3. Aislamiento de BAL

Para el aislamiento de BAL se aplicó un diseño factorial completamente al azar donde la variable independiente fue la fuente de aislamiento (tipo de forraje) con tres niveles (maíz, cebada y avena).

La unidad experimental fue definida como un tubo de PVC de 6 pulgadas de diámetro conteniendo 5 kilos del material picado y compactado. Se realizó el proceso en tres tubos de PVC por cada tipo de forraje (tres repeticiones) (figura 5).

Se procesó un kilo de material fermentado. Se pesó 25 gramos en 225mL de agua peptonada bufferada estéril manteniendo una relación de 1/10. Se procesó diluciones seriadas en base 10 para obtener una solución final de 1/10 exp 7.

Se inoculó 0,1 mL de cada dilución en medio de cultivo específico MRS (Man, Rogosa y Sharpe), para favorecer el crecimiento de BAL extendiendo la muestra en la superficie de la placa de agar con asa acodada de vidrio.

3.4. Identificación de BAL

Después de 24 horas de incubación a 35 °C en ambiente microaerófilico, las colonias características con apariencia redondeada, regular bordes definidos y blancas o blanco-amarillentas fueron analizadas con tinción Gram.

Se registró la morfología reacción a las pruebas de catalasa y oxidasa. Las colonias negativas para estas dos pruebas fueron seleccionadas y repicadas en placas de MRS agar.

Los cultivos puros en fase logarítmica de crecimiento fueron analizados con pruebas bioquímicas en la galería comercial API 50 CH.

Se seleccionó las colonias de las posibles BAL pertenecientes al género *Lactobacillus* sp.

Se repicaron y mantuvieron en congelación MRS + 10% de glicerol estéril como preservante.

3.5. Determinación de la cinética celular

Después de aislar e identificar las BAL, estas se mantuvieron en un medio de cultivo MRS con 1,5% de agar en una colección identificada.

Para el establecimiento del inóculo que se utilizó en la evaluación cinética posterior y en el proceso productivo, las bacterias fueron re picadas en caldo MRS e incubadas a 35 °C durante 24 horas en un ambiente de CO₂ al 5%. Se transfirió 1 mL del inóculo de cada cepa seleccionada a un tubo de ensayo de 10 mL de volumen nominal estéril.

Las bacterias fueron homogenizadas y 1 mL de este consorcio fue inoculado en un frasco conteniendo 600 mL de medio de cultivo estéril.

Para obtener un medio de cultivo más económico que el MRS, se estableció dos medios de cultivos semi industriales en donde se reemplazó las fuentes de carbono y nitrógeno y se midió su efectividad mediante la cinética de crecimiento de las BAL.

Los medios de cultivo utilizados fueron C1: melaza en una concentración de 15% p/v y C2: caldo de formulación industrial basada en 5,05% proteínas vegetales, 5,53% carbohidratos solubles (melaza) y 89,42% humedad.

Dentro de un período de 72 horas se tomaron muestras para recuento de bacterias ácido-lácticas cada tres horas. Se esperaba que las bacterias ácido-lácticas lleguen a fase estacionaria de crecimiento en aproximadamente 50 horas de acuerdo con el metabolismo descrito de BAL en medios de cultivo (Aznar & Zúñiga, 2011).

El conteo de las colonias se realizó por el método de diluciones sucesivas y siembra por extensión en placa en medio MRS por duplicado y con el apoyo del software Open CFU vs 3.9.0.

Cada unidad experimental fue definida como un frasco con volumen final de 600 mL de cultivo de BAL incubado a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 72 horas. Se realizaron 2 repeticiones por cada experimento.

Se dibujó la curva de crecimiento del inóculo bacteriano en cada medio de cultivo. En el eje "x" se registró el tiempo en horas y en el eje "y" se representó la concentración de bacterias del recuento haciendo el cálculo del logaritmo en base 10 de cada uno de los datos.

El diseño experimental se basó en un análisis de varianza de un solo factor cuyos niveles fueron los dos medios de cultivo utilizados C1 (melaza) y C2 (industrial).

Se comparó la dinámica de crecimiento y el rendimiento de los medios de cultivo comparando la concentración de BAL obtenida.

Adicionalmente, se consideró como variable de respuesta el pH. Se dibujó la curva de pH del inóculo bacteriano en cada medio de cultivo. En el eje “x” se registró el tiempo en horas y en el eje “y” se representó los valores de pH.

3.6. Determinación de concentración de ácido láctico

Otra variable de respuesta que se analizó es la concentración de ácido láctico producido por las BAL en los medios de cultivo en base a melaza o el medio de cultivo industrial.

Los inóculos bacterianos fueron centrifugados durante 15 minutos a 5000 rpm y se recolectó el sobrenadante para la determinación de la concentración de ácido láctico por medio del método colorimétrico. El método utiliza la enzima lactato oxidasa que en presencia de ácido láctico de la muestra forma peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es reducido, dando lugar a la formación de un compuesto coloreado cuya concentración es directamente proporcional a la concentración de ácido láctico presente en la muestra y que finalmente puede ser medido por fotometría convencional.

El límite de detección de la prueba fue de 0,2mmol/L y el límite de linealidad fue de 15,5 mmol/L de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial. Este ensayo se realizó en un laboratorio de referencia por lo que se mantiene la confidencialidad de la línea comercial que provee el reactivo utilizado.

Se dibujó la curva de concentración de ácido láctico del sobrenadante obtenido del inóculo bacteriano en cada medio de cultivo. En el eje "x" se registró el tiempo en horas y en el eje "y" se representó los valores de concentración de ácido láctico en g/L utilizando el peso molecular del ácido láctico 90,08g/mol como constante en el factor de conversión.

El diseño experimental se basó en un análisis de varianza de un solo factor cuyos niveles fueron los dos medios de cultivo utilizados melaza e industrial.

3.7. Diseño del biorreactor

Se asignó un área de 10 m² para la construcción del biorreactor para la propagación de bacterias ácido-lácticas.

El proceso de propagación se llevó a cabo en un reactor de polietileno hermético sin intercambio de materiales con el exterior, el mismo que consta de un tanque de 200 litros de capacidad, conectado con tuberías y accesorios de 1 pulgada de diámetro al sistema de recirculación.

Se implementó un sistema de agitación externo para la recirculación y homogenización, mediante el montaje de una bomba de caudal marca “Pedrollo” de ½ HP de potencia, el biorreactor cuenta además con válvulas para extracción del producto terminado, salida de gases producidos en el proceso de fermentación y un controlador para el funcionamiento de la bomba.

El biorreactor se ensambló como se indica en la figura 6, el diseño permite la recirculación periódica intermitente del sustrato para mantener la concentración homogénea, estimulando la cinética de crecimiento del consorcio, evitando lisis o muerte de las bacterias por exceso de turbulencias en el flujo y no permite la formación de puntos muertos lo que favorece a la formación de biopelículas al interior del sistema.

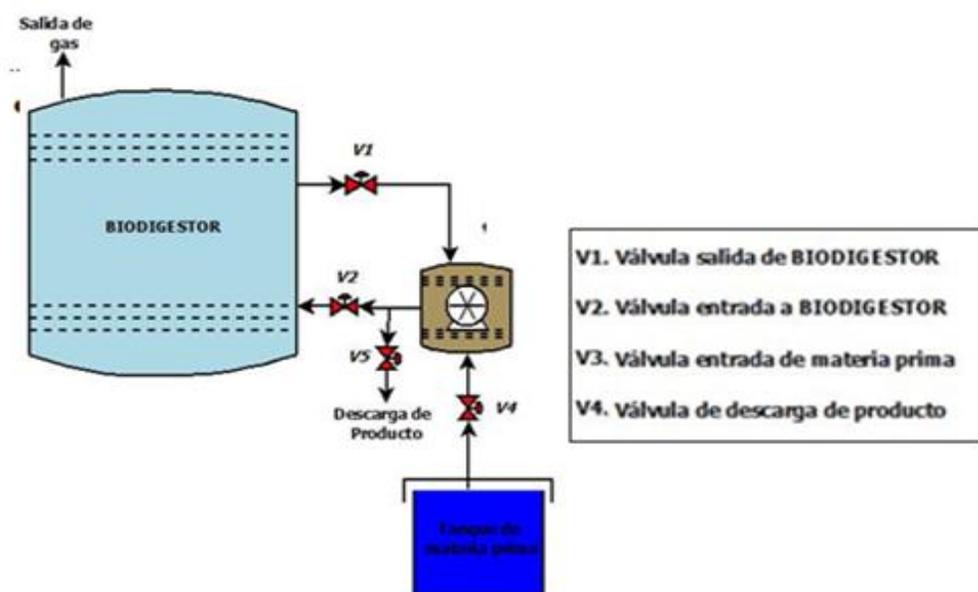


Figura 6. Diseño del ensamblaje del biorreactor.

Los parámetros considerados en el diseño del digestor se detallan a continuación:

3.7.1. Volumen del digestor

Es el espacio donde se da la fermentación del sustrato (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006). El volumen del reactor es de 200 litros.

V_t = volumen total del digestor

V_t = 200 litros

3.7.2. Volumen funcional del digestor

Es el 80% del volumen total del digestor, es decir es el volumen que ocupa el sustrato en el equipo (Moncayo, 2008). Para el diseño de esta investigación, el volumen funcional corresponde a 160 litros.

$V_f = V_t \times 0.80$

Dónde:

V_f = volumen funcional

V_t = volumen total

$V_f = 200L \times 0.80 = 160$ litros.

3.7.3. Carga inicial del inóculo

El inóculo inicial es un consorcio conformado por 3 especies de *Lactobacillus* aislados, con una concentración equitativa de 1×10^5 UFC/mL.

Se utilizaron las cepas de microorganismos que se analizó anteriormente en base a su dinámica de crecimiento en el medio de cultivo con el mejor rendimiento y eficiencia en la producción de ácido láctico.

Además, se consideró la factibilidad de incrementar la producción de microorganismos con un inóculo inicial correspondiente al 15% del sustrato inicial con un porcentaje de humedad del 90%.

$$V \text{ inóculo} = V_f \times 15\%$$

$$V \text{ inóculo} = 160 \text{ l} \times 0.15$$

$$V \text{ inóculo} = 24 \text{ litros.}$$

3.7.4. Volumen del sustrato

Para obtener una mezcla adecuada para la fermentación anaerobia se formuló un medio de cultivo tomando en cuenta los siguientes parámetros, como se indica en la tabla 1.

Tabla 1.
Composición del sustrato

Composición del sustrato	
Componente	Porcentaje
Proteína	5.05 %
Carbohidratos solubles (azúcares)	5.53 %
Humedad	89.42%

$$V \text{ sustrato} = V_f \times 15\%$$

$$V_{\text{sustrato}} = 160 \times 15\%$$

$$V_{\text{sustrato}} = 24 \text{ litros.}$$

La carga inicial del sustrato correspondió a 24 litros el mismo que se diluye con agua destilada en el homogenizador.

En la tabla 2, se muestra la cantidad de cada materia prima para la carga total del biorreactor.

Tabla 2.
Formulación preparada para el llenado del biorreactor.

Componente	Cantidad en litros
Inoculo inicial	24
Sustrato	24
Agua Destilada	112
Aforo total	160

3.7.5. Mezclado

Es una operación física que hace al fluido más uniforme, eliminando los gradientes de concentración de nutrientes, microambientes microbianos y de temperatura, este fenómeno se produce por el intercambio de materia entre los diferentes puntos del sistema para producir una mezcla completa final de componentes (Ertola, Yantorno, & Mignone, 2006).

El sistema de mezcla consistió en emplear una bomba de caudal que permite la homogenización del sustrato y de los microorganismos al interior del biorreactor, la potencia del equipo es de 0.5 Hp con un caudal de 80 litros por minuto, sin afectar la estructura física de los microorganismos ya que mantiene un flujo laminar en el sistema de recirculación. La bomba se instaló en un tanque externo al reactor, donde confluye la tubería de mezcla en recirculación y la tubería del tanque de premezcla, como se puede ver en la figura 7.

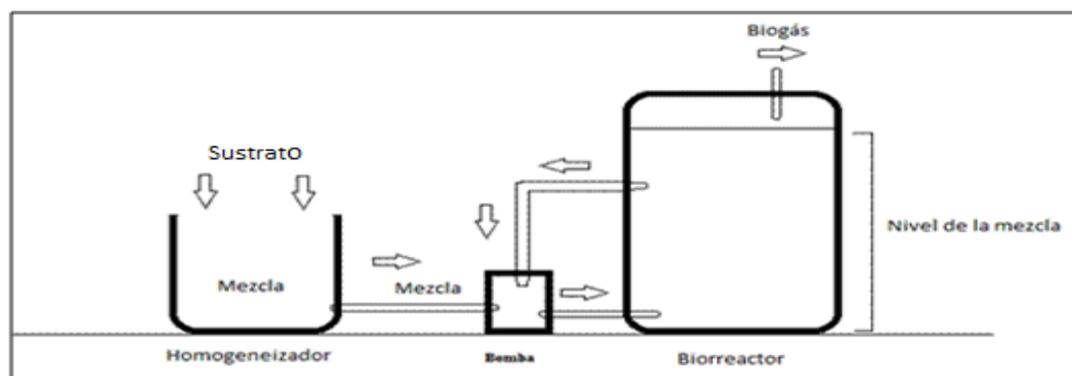


Figura 7. Esquema del diseño de agitación del biorreactor.

3.7.6. Cálculo del tiempo de residencia

Se realizó una inferencia en función de la ecuación obtenida tras el análisis de la cinética de crecimiento del consorcio de *Lactobacillus*, como se indica a continuación.

$$Y=1034 \ln (X) +6.4206$$

Y= Concentración en UFC/mL.

X= Tiempo en horas.

3.8. Plan de negocio

3.8.1. Investigación del mercado

Se realizó un análisis bibliográfico de la realidad del Ecuador tomando datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), con lo cual la empresa BIOAGROPEC determinó la naturaleza actual del sector agropecuario.

La investigación de mercado se realizó en la provincia de Pichincha, específicamente en el cantón Mejía, donde la empresa BIOAGROPEC pretende identificar la aceptación de la comercialización del producto, el cual posee muchos beneficios para el sector ganadero.

Se realizó un análisis del entorno tomando en cuenta la existencia de competencia en el mercado, y también se determinó el nivel de conocimiento sobre la elaboración de ensilaje y empleo de este como fuente de materia seca en la dieta del ganado bovino.

Con la información obtenida en la investigación de mercado y análisis del entorno, se determinó las bases para elaborar el plan de marketing, el cual permitió alcanzar los objetivos propuestos.

3.8.2. Dimensionamiento del mercado

Con los datos obtenidos de la investigación de mercado y el análisis del entorno, se realizó el dimensionamiento del mercado, el cual abarca a todos los productores ganaderos que se encuentren en la posibilidad de consumir inoculantes para una mejor fermentación y conservación de silo, para esto se definirán los siguientes parámetros:

Mercado total: Es el número de productores ganaderos, de la provincia de Pichincha del cantón Mejía.

Mercado Potencial: Son los productores específicamente lecheros que emplean ensilaje como fuente de materia seca para la dieta de su ganado.

Mercado Meta: Es el determinado en base a la investigación de productores de silo que están dispuestos a emplear inoculantes en la fermentación y conservación de forrajes.

3.8.3. Diseño de investigación

Se realizó una técnica de recolección de datos ampliamente utilizada por los investigadores a fin de obtener información acerca de la opinión del mercado meta, para determinar la viabilidad del producto. Se empleó la técnica de encuesta.

3.8.3.1. Diseño de Encuesta

Se analizó la necesidad de la comercialización de un inoculante biológico que sea ha empleado para la conservación de silos de gramíneas, para lo cual se elaboró una encuesta que permitió establecer la posible demanda de bioinoculantes que los productores ganaderos podrían requerir.

En la encuesta también se determinó el nivel de conocimiento sobre la elaboración de silo de maíz, avena o cebada, empleadas como fuente de materia seca en la dieta de ganado bovino. Ante la realidad de la actividad en la crianza de vacas productoras de leche, se determinó el nivel de aceptación del uso de inoculantes para la preservación de silos elaborados a partir de dichos forrajes en los productores lecheros de la sierra de Ecuador.

A continuación, se presenta el formato de encuesta utilizado para la investigación, el mismo que fue aplicado a los consumidores:

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
MAESTRÍA EN AGRICULTURA Y AGRONEGOCIOS SOSTENIBLES

La presente encuesta tiene como objetivo conocer las preferencias de los ganaderos al momento de dosificar fuentes alternativas en la dieta del ganado lechero.

Edad: _____

Género: M _____ F _____

Lugar de producción pecuaria _____

1.- Indique el número de vacas lecheras en su hato?

De 1 a 10 _____ De 100 en adelante _____

De 11 a 25 _____ otro _____

De 26 a 100 _____

2.- Cuál es el total de su producción de litros diarios de leche?

De 10 a 100 _____ De 501 a 1000 _____

De 101 a 200 _____ Mayor a 1000 _____

De 201 a 500 _____

3.- Cuál es el promedio de producción en litros de su hato lechero?

De 1 a 4 _____ Mayor a 10 _____

De 5 a 10 _____

4.- Seleccione el material que usted emplea en mayor cantidad como suplemento alimenticio adicional en la dieta de su ganado lechero?

Balanceado _____ Afrecho de cerveza _____

Ensilaje _____ Henolaje _____

Residuo de Plátano _____ otro _____

5.- Usted ha suministrado silo en la dieta diaria de su ganado lechero?

Si _____ No _____

6.- Si la respuesta anterior fue SI, indique el origen del silo dosificado en su hato lechero.

Compra _____

Producción propia _____

7.- Si usted produce silo en sus instalaciones indique el material del cual lo elabora.

Pasto _____

Maíz _____

Avena _____

Caña de azúcar _____

Mezcla de gramíneas _____

Otro _____

8.- Qué cantidad de silo en toneladas elabora al año?

De 1 a 5 _____

De 10 a 20 _____

De 5 a 10 _____

Mayor a 20 _____

9.- Usted ha empleado microorganismos para la fermentación y preservación de su silo?

Si _____

No _____

10.-. Estaría dispuesto a emplear microorganismos productores de ácido láctico en su silo?

Si _____

No _____

11.- Es de su preferencia que el inoculante empleado en la elaboración de silo sea?

Sólido _____

Líquido _____

12.- Usted considera que el uso de microorganismos mejora las condiciones de preservación del material a ensilar y disminuye el tiempo de fermentación?

Si _____

No _____

3.8.4. Población

El tamaño de la población se encuentra conformado por el total de productores ganaderos de la provincia de Pichincha, específicamente del cantón Mejía.

La población total de productores ganaderos de la provincia de Pichincha es de 23.278 y de esto el 12,5% corresponden a los productores del cantón Mejía (INEC, 2016).

3.8.5. Muestra

Para determinar las probabilidades de aceptación o rechazo acerca del uso de microorganismos para la fermentación y conservación de forrajes, se llevó a cabo una prueba piloto (ver anexo 1), la cual arrojó los resultados mostrados en la tabla 3.

Tabla 3.

Resultados de la prueba piloto de aceptación o rechazo de uso de un bioinoculante.

Respuestas	Número	Porcentaje
Aceptación (p)	26	86,6%
Negativas (q)	4	13,3%

La fórmula que se utilizó para encontrar el tamaño de la muestra es la siguiente:

$$n = \frac{Nz^2p(1 - p)}{(N - 1)E^2 + z^2p(1 - p)}$$

Dónde:

N: Población.

z: Nivel de Confianza

E: Margen de error

P: Porcentaje de probabilidad de éxito.

Calculo de n:

$$n = \frac{(1,96)^2 * 0,866 * 0,133 * 23278}{(0,05)^2 * (23278 - 1) + (1,96)^2 * 0,866 * 0,133}$$

$$n = 195$$

Se obtiene como resultado que el tamaño de la muestra es 195 ganaderos, la encuesta se realizó de manera aleatoria.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1. Investigación técnica

4.1.1. Aislamiento de bacterias ácido-lácticas (BAL)

Se preparó tubos de PVC de 6 pulgadas como matriz de fermentación de tres tipos de forraje (maíz, cebada y avena), con 5 kilos de material fermentable que fue compactado a presión. El proceso se realizó por triplicado, durante 21 días garantizando la anaerobiosis con sello plástico hermético en la boca de cada tubo.

Una vez cumplido el período de fermentación, 1 kilo de material fermentado de cada tubo se homogenizó y se pesó 25 g de cada muestra en frascos de 1 litro de capacidad nominal estériles.

Se procesaron como se describe en la metodología para el aislamiento de bacterias ácido-lácticas en medio de cultivo MRS por extensión en placa utilizando 100 µL de inóculo.

La figura 8, ejemplifica la recuperación de colonias aisladas blancas brillantes, redondas, cóncavas de bordes regulares de tamaño pequeño a mediano a partir del silo de maíz. Del silo de avena y cebada se observó además crecimiento de levaduras.

Se analizó las colonias de bacterias con aspecto diferenciable y se hizo un subcultivo en un nuevo MRS.

Los análisis morfológicos de las colonias demostraron el aislamiento y selección de bacilos y diplococos alargados Gram positivos. Adicionalmente se confirmó la selección con una prueba de catalasa utilizando peróxido de hidrógeno al 3% y oxidasa en discos de monoclóridato de p-aminodimetilanilina al 6%.

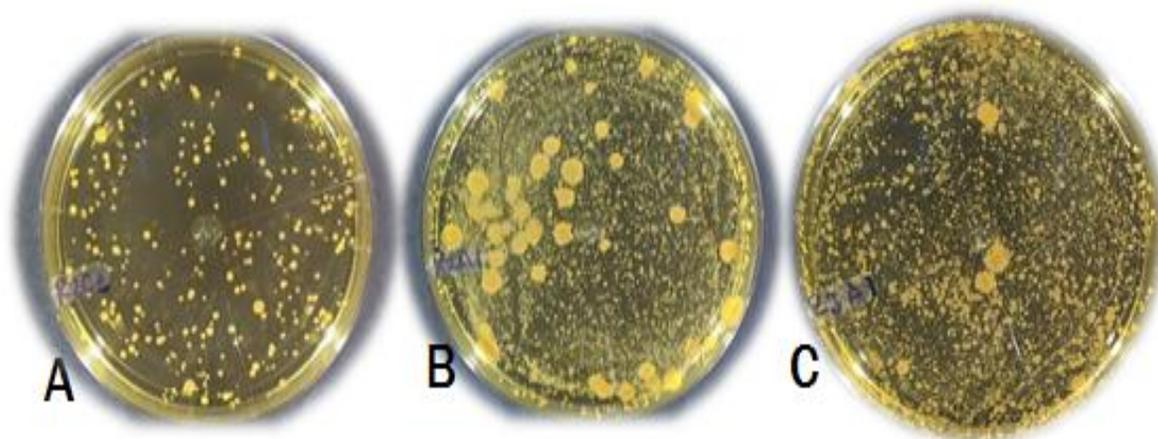


Figura 8. Recuento de bacterias ácido-lácticas a partir de muestras de silo de maíz (A), Cebada (B) y Avena (C).

4.1.2. Identificación de las bacterias ácido – lácticas

Cuatro colonias de microorganismos con apariencia distinguible macroscópicamente, Gram positivos y con respuesta negativa para las pruebas de catalasa y oxidasa fueron sub-cultivadas en agar MRS.

Una vez que las bacterias alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento (24h a 35°C en 5% de CO₂) fue utilizado para la identificación bioquímica de las mismas utilizando API CH 50L (Biomerieux).

Los resultados demostraron la identificación de: A) *Lactobacillus acidophilus* (Porcentaje de identidad, ID 99,2%), B) *Lactobacillus plantarum* (ID 98,8%), C) *Lactobacillus collinoides* (ID 99,0%), D) *Lactobacillus brevis* (ID 56.1%) (figura 9).

Considerando el nivel bajo de identidad alcanzado por la cepa aislada e identificada como *Lactobacillus brevis*, se decidió no tomarla en consideración para la conformación del consorcio.

Todas las cepas aisladas fueron conservadas en congelación en medios de cultivo MRS con 10% de glicerol.

4.1.3. Determinación de la cinética celular

A partir de cultivos puros de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus collinoides*, se prepararon eluciones con la turbidez equivalente a 1 en la escala de Mc Farland para posteriormente hacer una mezcla equitativa con 1 mL de cada elución.

La concentración de bacterias ácido-lácticas del inóculo fue de 1×10^6 confirmada con el ensayo de extensión en placa en medio MRS.

Los recuentos de las bacterias ácido-lácticas se trabajaron con el Software open CFU vs 3.9.0 con los parámetros siguientes: umbral invertido; radio entre 1 y 160 y limitada por una máscara definida alrededor de la imagen de la caja Petri de 90mm de diámetro (figura 10).

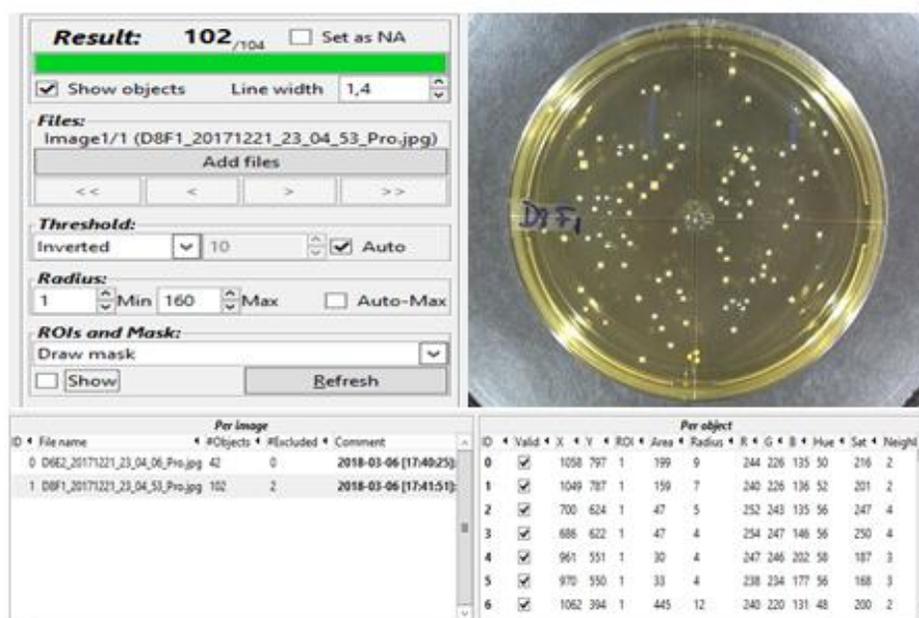


Figura 10. Parámetros de evaluación para el recuento de colonias en la caja Petri y ventana de resultados del software Open CFU vs 3.9.0.

Para obtener la curva de la cinética de crecimiento se calculó el logaritmo base 10 de los recuentos bacterianos (anexo 2). Considerando que el inóculo inicial fue una mezcla equitativa de las tres cepas del microorganismo aislado en fase logarítmica de crecimiento con una concentración de 10×10^3 UFC/mL, se tabuló y organizó el registro de datos de los recuentos recuperados a partir de la segunda hora de incubación.

En la figura 11, se puede evidenciar diferencia en el crecimiento entre las curvas del medio de cultivo C1 (melaza) y C2 (industrial). Se puede apreciar que con el medio de cultivo C2 existe un mayor crecimiento y aumento celular llegando a una densidad celular de hasta 12 logaritmos de UFC/mL. En el software Combase se modeló el crecimiento de los *Lactobacillus* sp., en C2 y se observó el ajuste al modelo Baranyi and Roberts (figura 11), se establece ausencia de fase lag en la curva lo cual responde a las condiciones experimentales que se emplearon en este estudio. La diferencia de la curva cinética con el medio de cultivo C1 se establece por su crecimiento y aumento celular es menor, por lo tanto, su densidad celular es más baja que con C2. También se puede evidenciar que con el medio C1 y C2 la fase exponencial comienza alrededor de la hora 10 y el crecimiento es progresivo. Sin embargo, a la hora 40, se observa la divergencia en el crecimiento de las bacterias considerando el medio de cultivo como único factor distinguible.

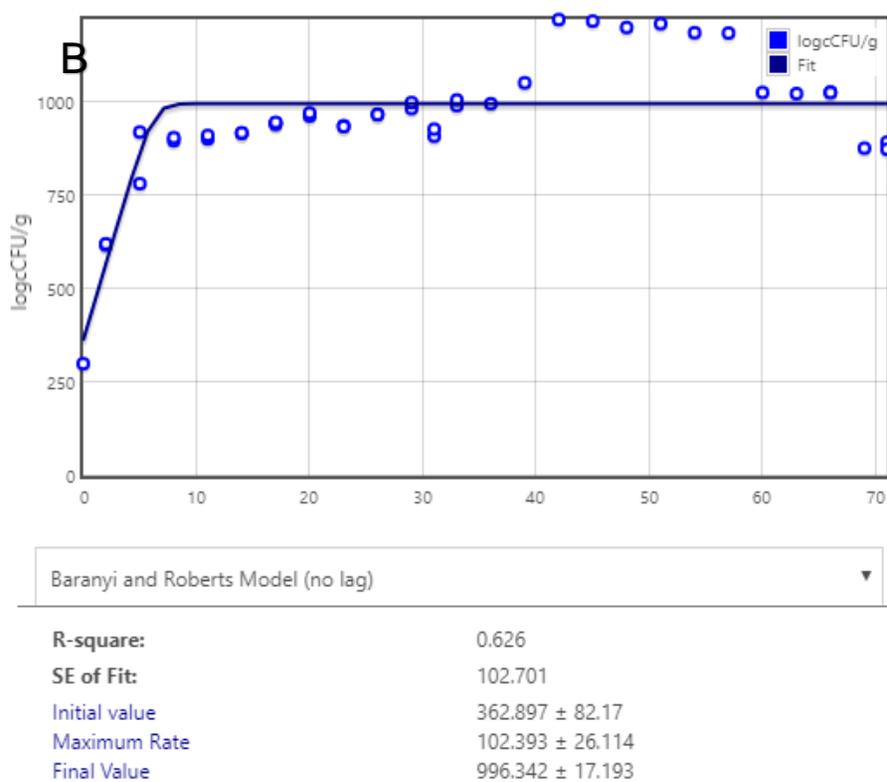
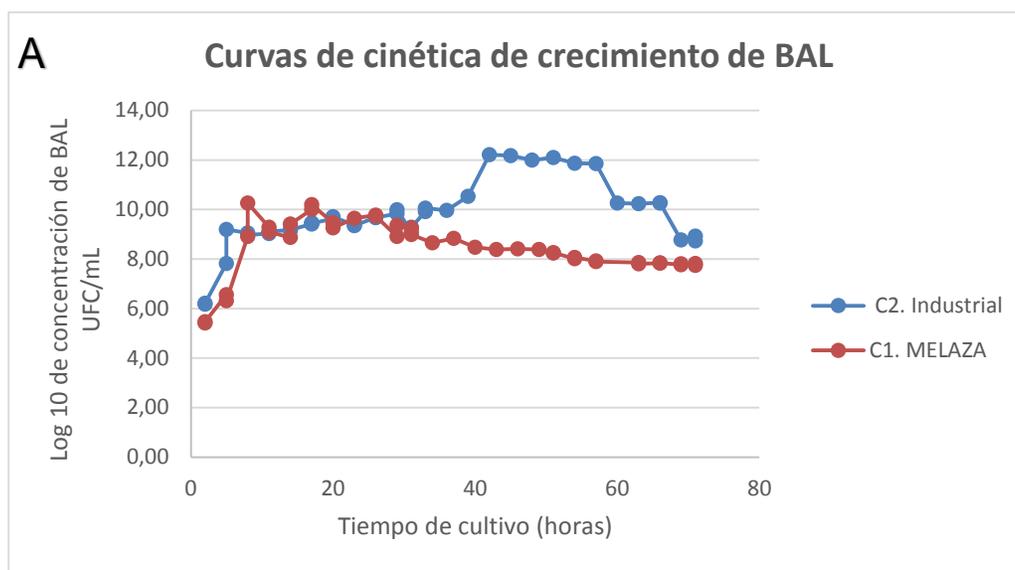


Figura 11. A. Ensayo de cinética de crecimiento (Log base 10 de UFC/ml vs tiempo) B. Ajuste de la curva de crecimiento en el medio de cultivo industrial al modelo matemático Baranyi and Roberts (software Combase).

Para evidenciar de una mejor manera la diferencia entre los dos medios de cultivo C1 y C2, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), en donde se observó diferencias estadísticamente significativas entre los dos medios de cultivo (figura 12).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31,82	1	31,82	21,06	<0,0001
Medio de cultivo	31,82	1	31,82	21,06	<0,0001
Error	119,38	79	1,51		
Total	151,20	80			

Figura 12. Análisis de varianza (ANOVA) para los medios de cultivo utilizados en la cinética de crecimiento.

Se empleó la prueba de Duncan para determinar si existe diferencia estadística en los medios de cultivo C1 y C2, el cual mostró dos subconjuntos; de acuerdo con las medias se puede observar que el subconjunto B agrupa al medio de cultivo C2, el mismo que corresponde al mejor tratamiento con una densidad celular promedio mayor (figura 13).

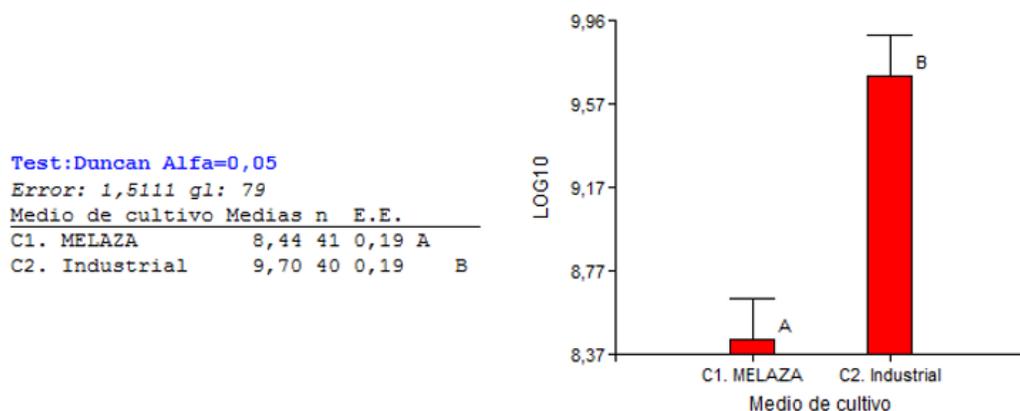


Figura 13 Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los medios de cultivo C1 y C2 para la cinética de crecimiento.

De acuerdo con la figura 14, se cumple con el supuesto de normalidad para los residuos, necesario en un diseño experimental paramétrico.

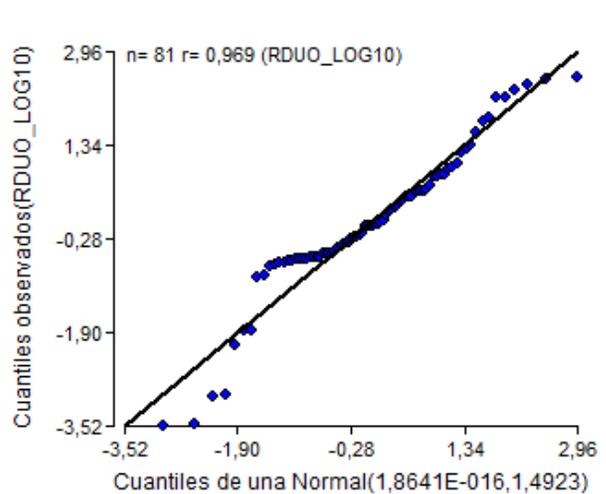


Figura 14. Gráfica descriptiva de la normalidad de la variable densidad celular respecto a los medios de cultivo C1 y C2.

También se obtuvo la curva de pH vs tiempo, donde se puede evidenciar la caída de pH, debido a la formación de ácido láctico en los dos medios de cultivo industriales utilizados (figura 15).

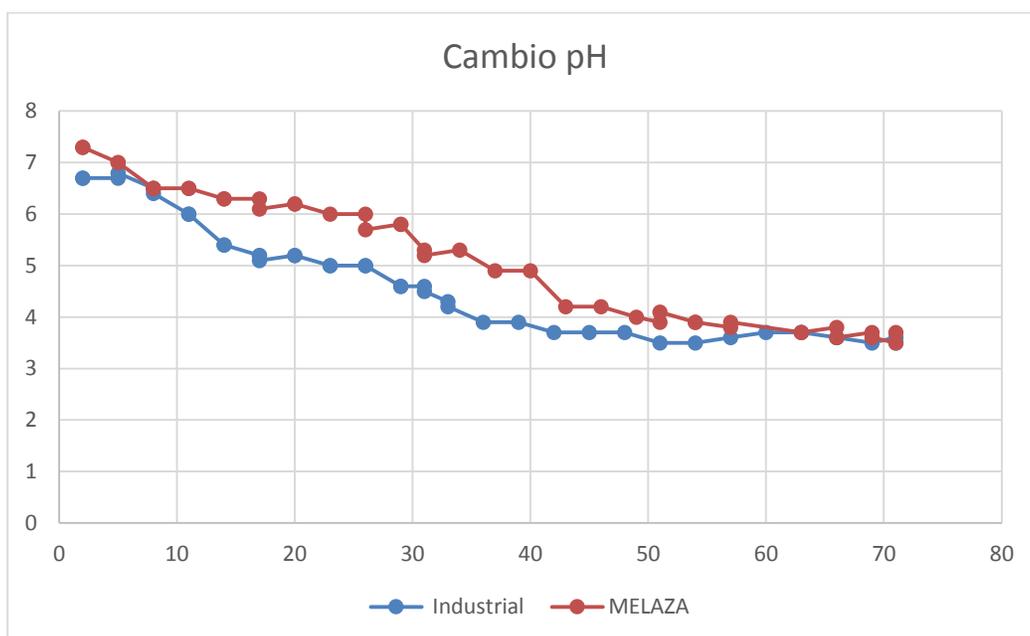


Figura 15. Curva del pH en función del tiempo en horas.

Para evidenciar si existe o no diferencia entre los dos medios de cultivo C1 y C2 en base a la variable pH, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), en donde no se observó diferencias estadísticas significativas (figura 16).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,63	1	3,63	2,63	0,1089
Medio de cultivo	3,63	1	3,63	2,63	0,1089
Error	108,94	79	1,38		
Total	112,57	80			

Figura 16. Análisis de varianza (ANOVA) para los medios de cultivo utilizados en base a la variable de respuesta pH.

Para corroborar que no existe diferencia estadística significativa entre los medios de cultivo C1 y C2, se empleó la prueba de Duncan; de acuerdo con las medias se puede observar un solo subconjunto (figura 17).

Test:Duncan Alfa=0,05
 Error: 1,3790 gl: 79

Medio de cultivo	Medias	n	E.E.
C2. Industrial	4,75	40	0,19 A
C1. MELAZA	5,17	41	0,18 A

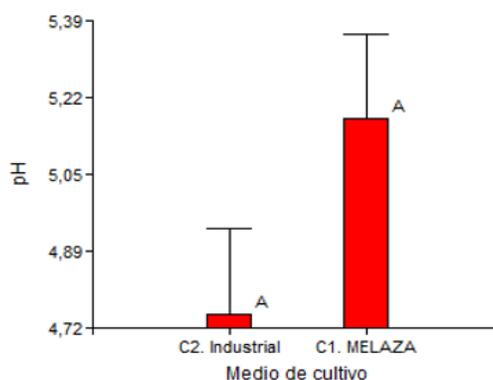


Figura 17. Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los medios de cultivo C1 y C2 para la cinética de crecimiento.

4.1.4. Concentración ácido láctico

A partir del sobrenadante recolectado de los inóculos bacterianos en los dos medios de cultivo, se analizó la concentración de ácido láctico en gramos por litro.

En la figura 18, se puede evidenciar diferencia en la concentración de ácido láctico del medio de cultivo C1 (melaza) y C2 (industrial). Se puede apreciar que con el medio de cultivo C2 existe una mayor producción de ácido láctico en menos tiempo, a diferencia de la concentración obtenida con el medio de cultivo C1.

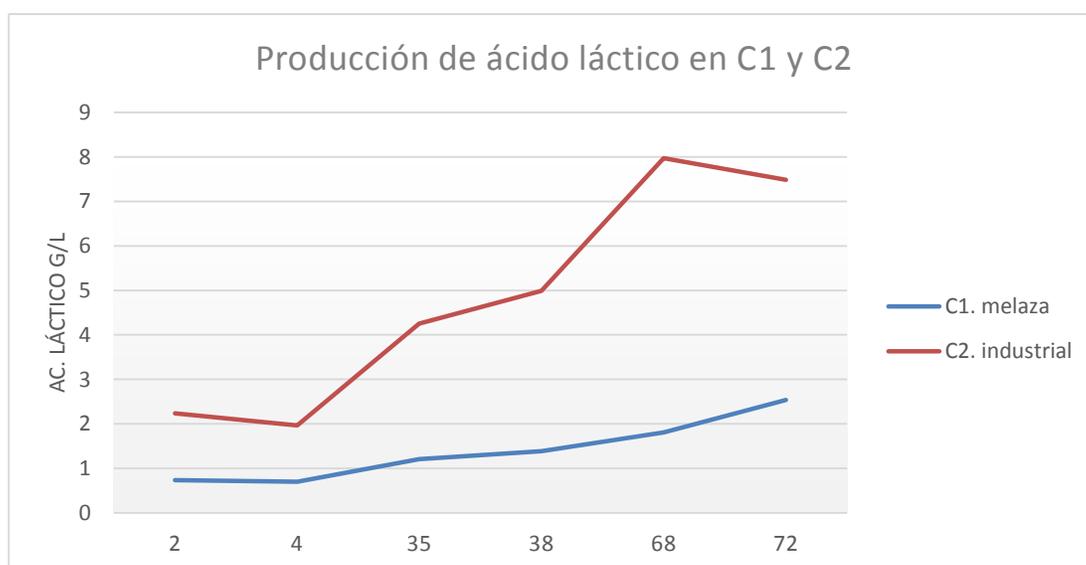


Figura 18. Concentración de ácido láctico en medio de cultivo C1 y C2.

Para evidenciar de una mejor manera la diferencia entre los dos medios de cultivo C1 y C2, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), en donde se observó

diferencias estadísticamente significativas entre los dos medios de cultivo en base a la variable de respuesta concentración de ácido láctico (figura 19).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	35,06	1	35,06	10,11	0,0098
Medio	35,06	1	35,06	10,11	0,0098
Error	34,67	10	3,47		
Total	69,73	11			

Figura 19. Análisis de varianza (ANOVA) para los medios de cultivo utilizados en base a la variable de respuesta pH.

Se empleó la prueba de Duncan para determinar si existe diferencia estadística en los medios de cultivo C1 y C2, el cual mostró dos subconjuntos; de acuerdo a las medias se puede observar que el subconjunto B agrupa al medio de cultivo C2, el mismo que corresponde al mejor tratamiento con concentración de ácido láctico promedio mayor (figura 20).

Test:Duncan Alfa=0,05
Error: 3,4669 gl: 10

Medio	Medias	n	E.E.	
C1. melaza	1,40	6	0,76	A
C2. industrial	4,82	6	0,76	B

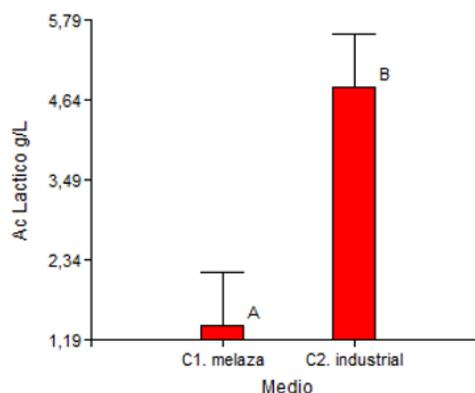


Figura 20. Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los medios de cultivo C1 y C2 para la variable concentración de ácido láctico.

4.2. Biorreactor para la producción del BAL

Se utilizó un tanque de polietileno de 200 litros de capacidad, se conectó una bomba de 0.5Hp de potencia con tuberías de polietileno de 1 pulgada de diámetro, para evitar el taponamiento por formación de biopelículas (figura 21).



Figura 21. Biorreactor para la producción de consorcio de BAL.

En función del balance de masas propuesto en la metodología se implementó el biorreactor tomando en cuenta el esquema del diseño, el volumen funcional es de 160 litros.

La carga inicial del sistema se realizó mediante la adición de 24 litros de inóculo principal obtenidos en el proceso de aislamiento, 24 litros de medio de cultivo industrial y 112 litros de agua.

Para el inóculo inicial se tomaron las cepas aisladas de; *L. Plantarum*, *L. Acidophilus* y *L. Collinoides*. Se alcanzó un volumen de 24 litros con una población inicial de 1×10^5 UFC/mL de cada una de ellas.

Para cumplir con los requerimientos nutricionales se emplearon 24 litros del medio de cultivo industrial con un contenido de: 5.05% de proteína, 5.53% de carbohidrato y un contenido de humedad del 89.42%, se aforó el biorreactor a 160 litros y se tomó en cuenta la cinética de crecimiento del consorcio determinando el tiempo en días para su extracción.

La concentración adecuada del producto terminado es de 1×10^9 UFC/mL del consorcio de *Lactobacillus*, tomando la ecuación de la cinética se estimó un tiempo de 15 horas en condiciones controladas de: anaerobiosis, temperatura de 37 °C y agitación permanente.

Las condiciones ambientales donde se ensambló el equipo fueron distintas, entre 15 y 25 °C de temperatura en el entorno del equipo, debido a parámetros de operación de la bomba, los tiempos de agitación fueron de 6 horas al día con intervalos de 4 horas de descanso, alcanzando la concentración deseada a las 48 horas de operación.

4.3. Resultado de la investigación de mercado

A continuación se indica la interpretación de los resultados obtenidos en las preguntas realizadas a productores ganaderos de la Provincia de Pichincha.

1.- Indique el número de vacas lecheras en su hato?

De las respuestas obtenidas, se indica el número promedio de vacas en el hato lechero, el 37.95% de la población tiene entre 26 y 100 vacas, entre 11 y 25 vacas el 29.23%, seguido de productores entre 1 y 10 vacas con el 18.97% y por último los productores con un hato mayor a 100 vacas con el 13.85%, a continuación se indica la distribución de los datos en la figura 22.

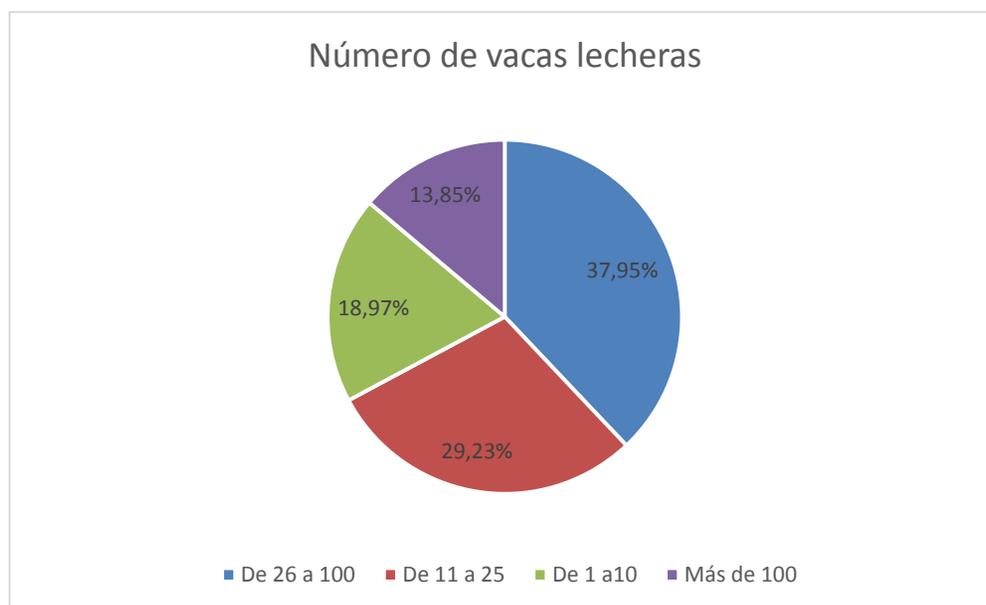


Figura 22. Número de vacas lecheras en el hato.

2.- Cuál es el total de su producción de litros diarios de leche?

Del total de productores, el 35.9% tiene una producción de leche entre 201 y 500 litros diarios, con un porcentaje del 27.18% se encuentran los productores entre 501 y 1000 litros diarios, seguido de los productores con valores de producción entre 101 a 200 litros por día con el 18.97%. Los productores con niveles mayores a los 1000 litros diarios ocupan el cuarto puesto con el 10.77% de la población, por último

con el 7.18% los ganaderos con valores de producción diaria entre 10 y 100 litros (figura 23).

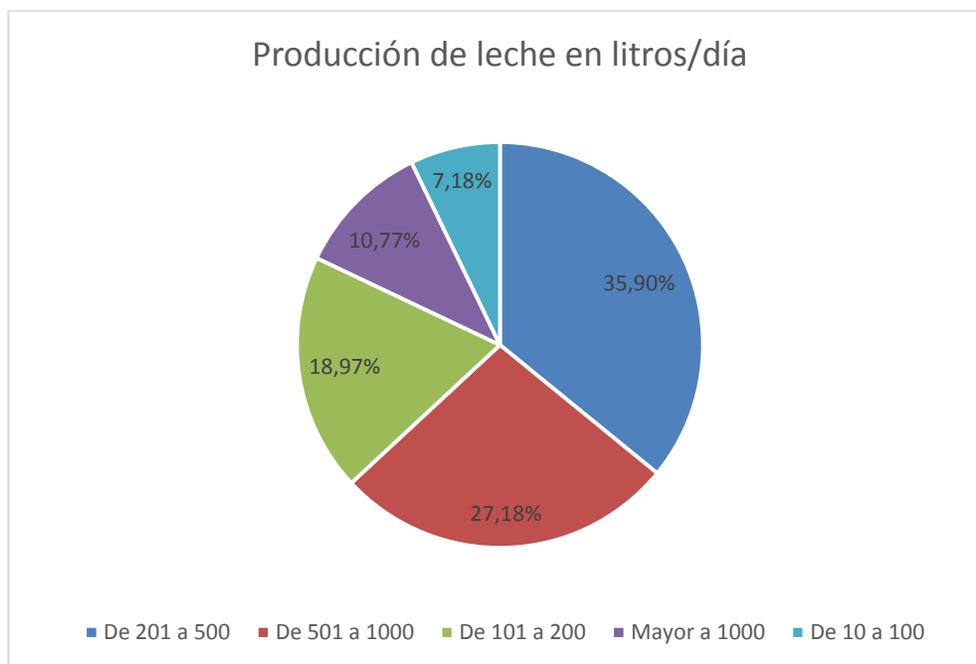


Figura 23. Producción de leche en litros por día.

3.- Cuál es el promedio de producción en litros de su hato lechero?

De los datos obtenidos, el 52.82% de la población encuestada se encuentra en un promedio de producción de entre 5 y 10 litros de leche día por vaca ordeñada, el 28.21% de productores lecheros tiene un promedio diario mayor a 10 litros de leche y por último, productores con el 18.97% de la población se encuentra en un promedio diario entre 1 y 4 litros (figura 24).

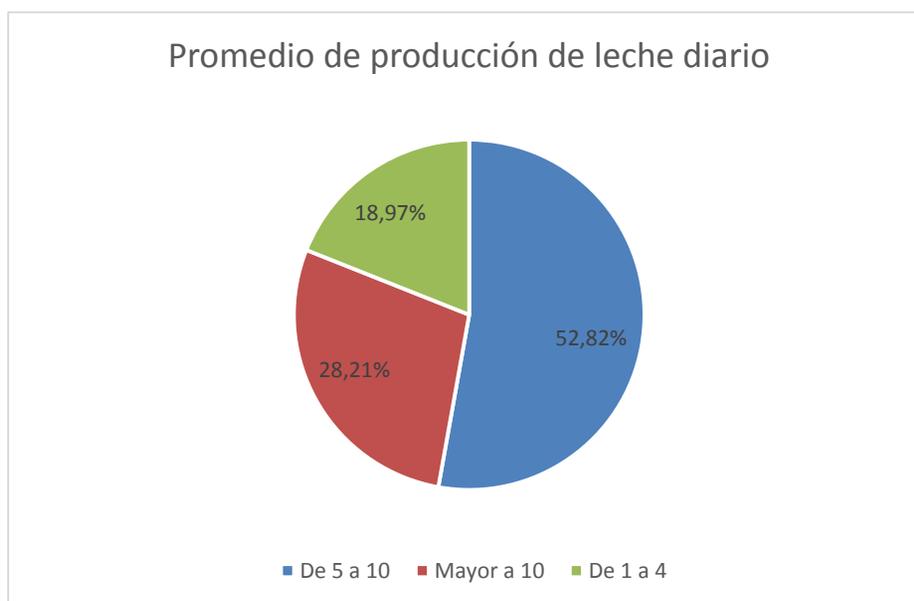


Figura 24. Promedio de producción diario de leche por vaca ordeñada.

4.- Seleccione el material que usted emplea en mayor cantidad como suplemento alimenticio adicional en la dieta de su ganado lechero?

Como se observa en la figura 25, el mayor porcentaje de la población con el 37.95% emplea como suplemento alimenticio alimentos balanceados para cubrir la dieta del animal, el 33.85% de los ganaderos emplean silo adicional a la dieta diaria, los productores que emplean henolaje son el 10.77% de la población. El 8.21% de los encuestados prefieren suministrar a la dieta de su ganado lechero afrecho de cerveza y el 6.15% adiciona, a la dieta residuo de plátano, por último con el 3.08% de ganaderos, emplea otro aditivo en la dieta diaria de su hato lechero.

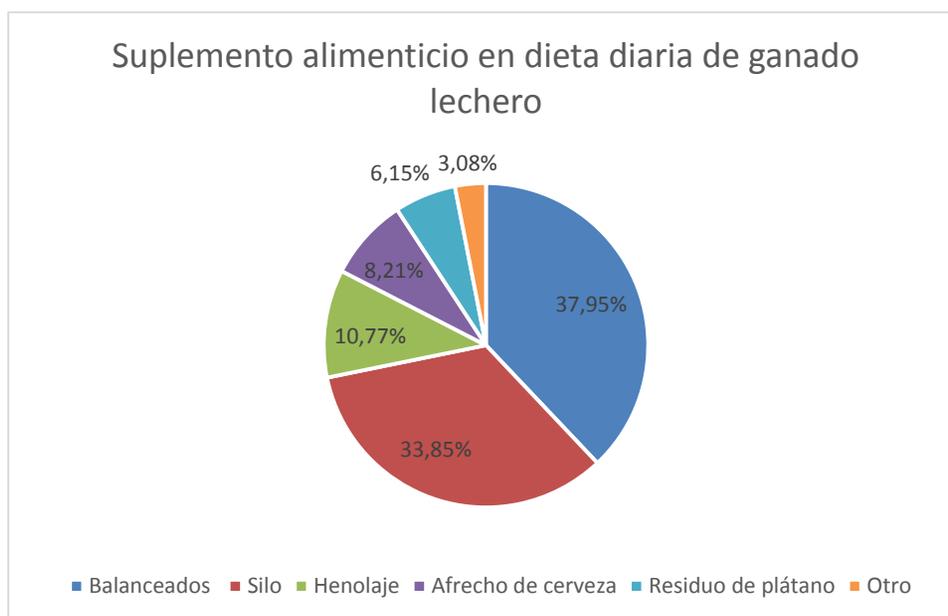


Figura 25. Suplemento alimenticio en la dieta diaria de ganado lechero.

5.- Usted ha suministrado silo en la dieta diaria de su ganado lechero?

Del total de los encuestados el 64.1% ha suministrado silo, el 35.9% de los productores no ha empleado silo en la dieta de su hato lechero (figura 26).



Figura 26. Uso de silo en la dieta diaria en ganado lechero.

6.- Si la respuesta anterior fue SI, indique el origen del silo dosificado en su hato lechero.

De los encuestados que han empleado silo en dieta diaria de su hato lechero el 61.03% ha adquirido el silo, mientras que el 38.97% de los encuestados elabora el silo en sus instalaciones (figura 27).

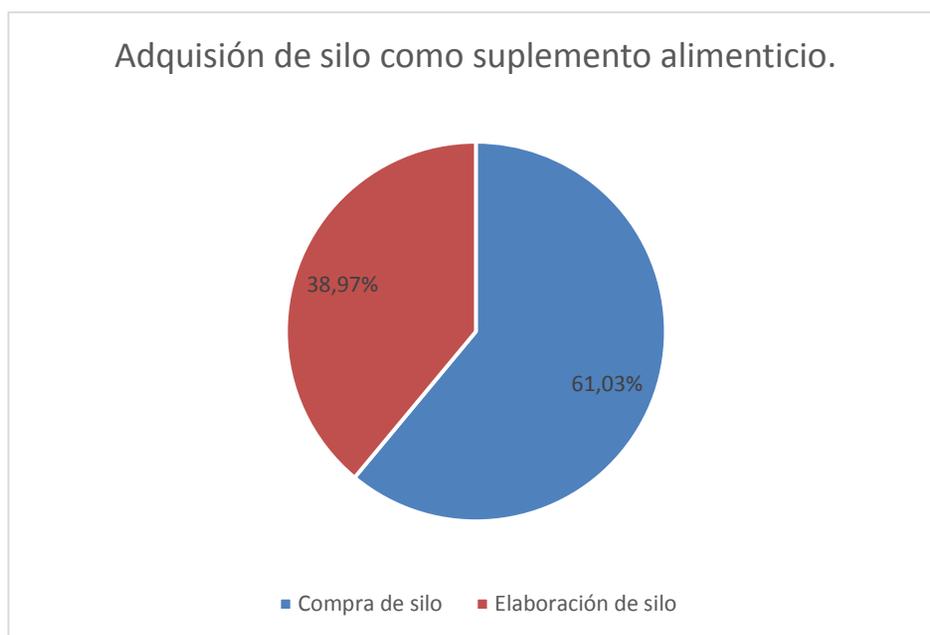


Figura 27. Adquisición de silo como suplemento alimenticio.

7.- Si usted produce silo en sus instalaciones indique el material del cual lo elabora.

Como se observa en la figura 28 , del total de los encuestados, los productores que elaboran silo en sus instalaciones emplean como fuente de materia seca los siguiente elementos: el 62.05% usan maíz como fuente de materia para la conservación en su silo, en segundo lugar emplean pasto como fuente de materia verde con el 17.95% de los encuestados, el 9.74% elabora silos con mezclas de gramíneas, el 6.15% de los encuestados emplea avena como materia prima para su silo, el 3.08% emplea residuos de caña y por último el 1.03% emplea una fuente distinta a las mencionadas con anterioridad.

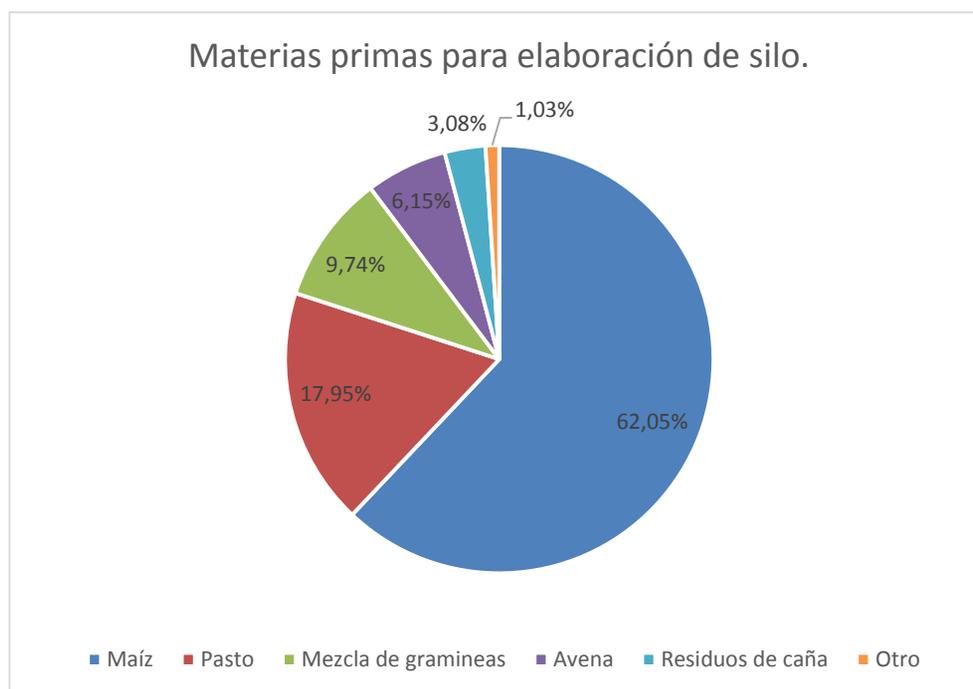


Figura 28. Materias primas empleadas en la elaboración de silos.

8.- ¿Qué cantidad de silo en toneladas elabora al año?

De los productores que elaboran silo el 49.23% mantiene una producción mayor a 50 toneladas al año, el 21.03% de la población mantienen una producción anual de entre 31 y 40 toneladas, de los productores el 17.95% elabora silo entre 11 y 30 toneladas anuales y por último los productores que ensilan entre 1 y 10 toneladas son el 11.79% del total encuestados (figura 29).

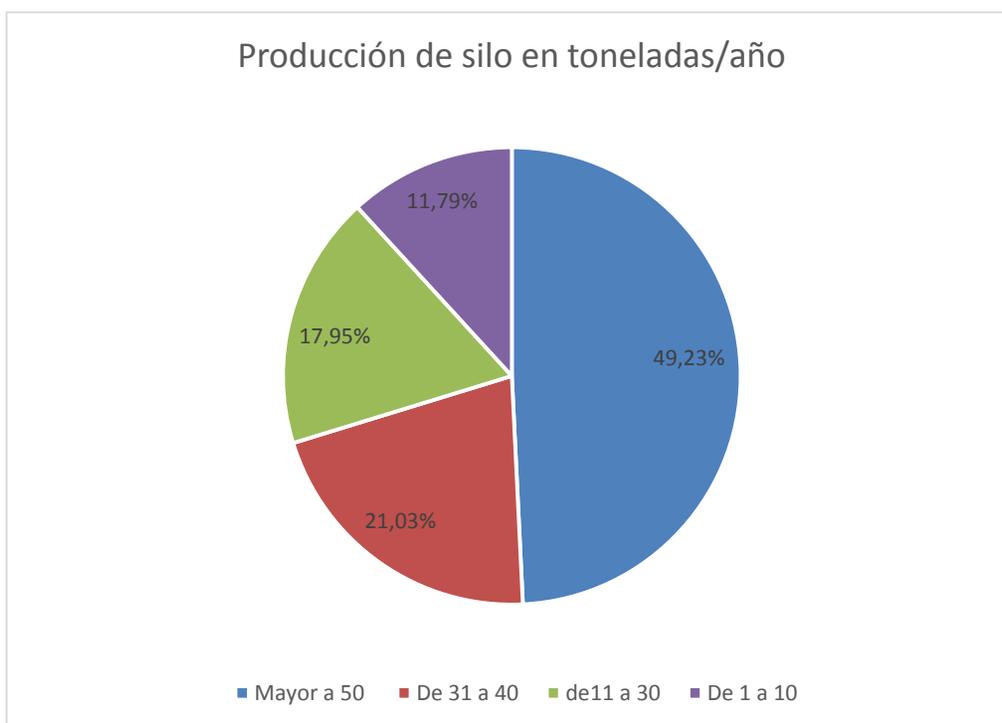


Figura 29. Producción de silo en toneladas por año.

9.- Usted ha empleado microorganismo para la fermentación y preservación de su silo?

De los productores ganaderos que han elaborado silo en sus instalaciones el 68.21% no ha empleado microorganismos para la fermentación de su material a conservar, mientras que el 31.79% de los encuestados si han empleado inoculantes microbiológicos para la fermentación y conservación de su silo, como se observa en la figura 30.

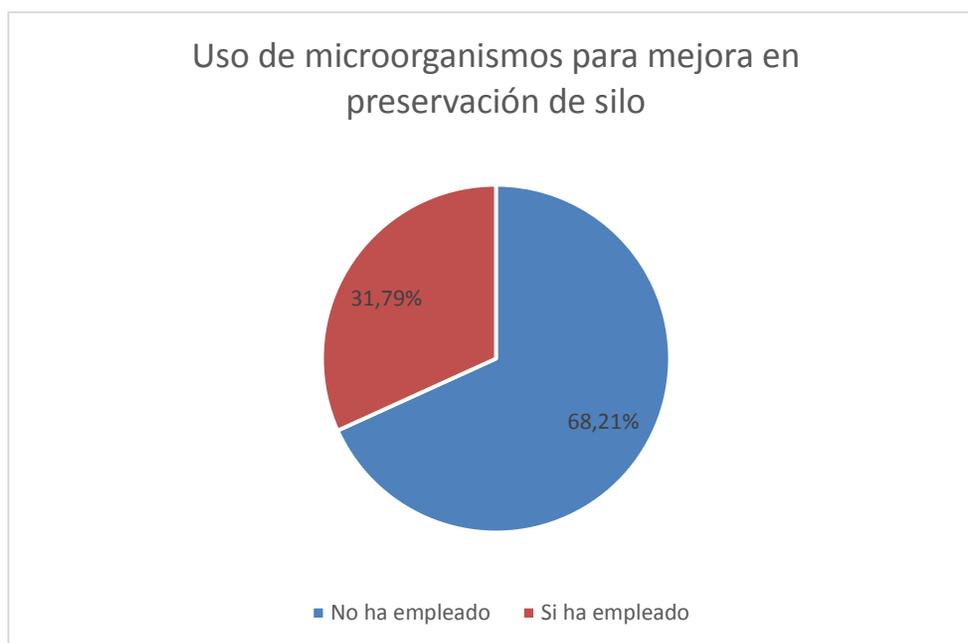


Figura 30. Uso de microorganismos en la fermentación y conservación de silos.

10.-. ¿Estaría dispuesto a emplear microorganismos productores de ácido láctico en su silo?

El 96.92% de los encuestados ha manifestado que están dispuestos a usar microorganismos para la conservación de silos, mientras que el 3.08% de los productores lecheros no emplearían inoculantes en la producción de silo (figura 31).

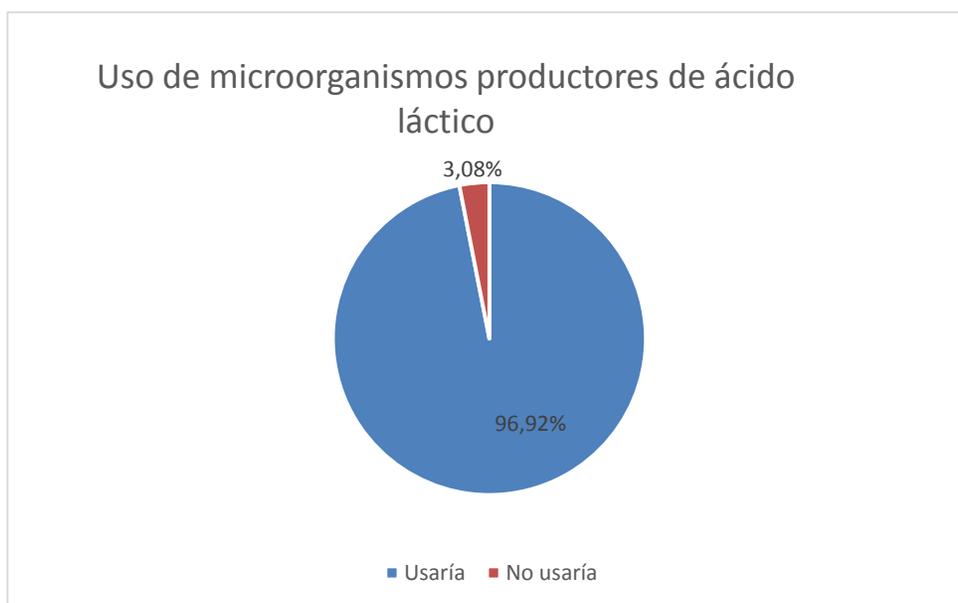


Figura 31. Apertura al uso de microorganismos productores de ácido láctico en la elaboración de silo.

11.- Es de su preferencia que el inoculante empleado en la elaboración de silo sea:

Como se observa en la figura 32, los productores con el 95.90% de preferencia emplearían inoculantes líquidos en la conformación de su silo, mientras que tan solo el 4.1% de los encuestados están dispuestos a emplear inoculantes sólidos para mejorar las condiciones de conservación del silo.

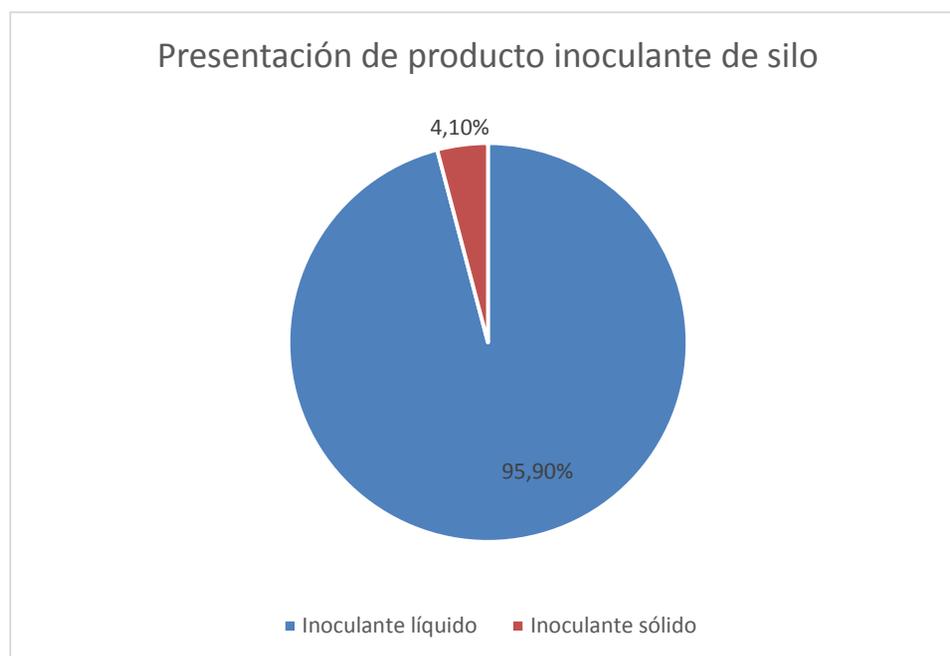


Figura 32. Preferencia en la presentación del producto por parte de productores de silo.

12.- Usted considera que el uso de microorganismos mejora las condiciones de preservación del material a ensilar y disminuye el tiempo de fermentación?

El 99.92% de los encuestados consideran que el uso de microorganismos mejora las condiciones de fermentación y conservación de su silo, mientras que el 3.08% de los encuestados no considera útil el uso de estos (figura 33).

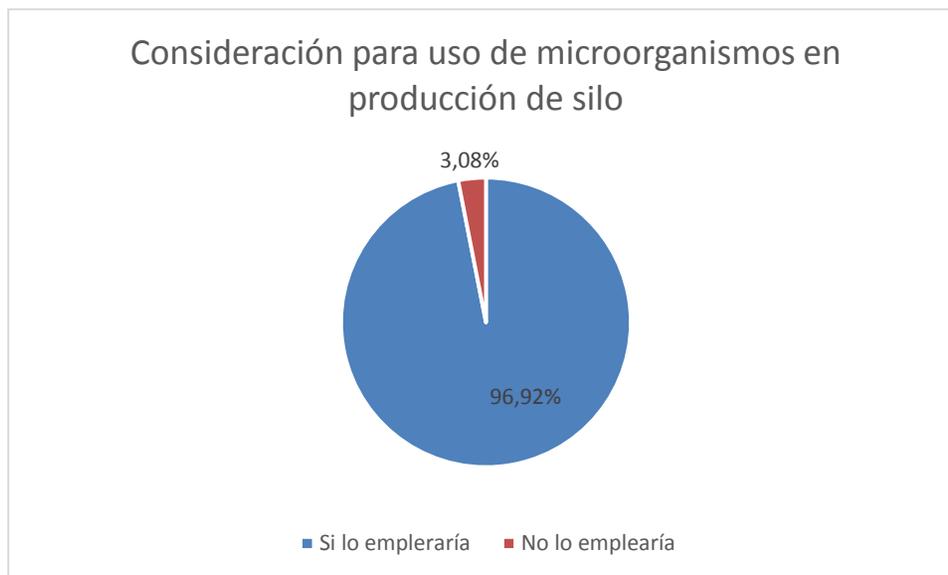


Figura 33. Consideración del uso de microorganismos en la producción de silo

CAPÍTULO 5

PROPUESTA DE COMERCIALIZACIÓN Y/O MARKETING

El plan de marketing tiene por objetivo desarrollar las estrategias necesarias en el mercado para obtener la satisfacción del cliente, aprovechando las fortalezas de la empresa.

La empresa BIOAGROPEC tiene interés en desarrollar tecnología propia en el ámbito de los aditivos biológicos para el proceso de ensilaje, por lo tanto después de obtener resultados positivos en el aislamiento, caracterización y evaluación de un consorcio de BAL; el objetivo de la empresa es elaborar un plan de marketing estratégico para la promoción y comercialización del producto dirigida al mercado de productores de ganado de la provincia de Pichincha.

5.1. Historia, misión y visión Empresarial

Historia

Fundada en 2015, BIOAGROPEC es una empresa ecuatoriana dirigida a proveer al sector agropecuario de soluciones sustentables y aplicables con productos y procesos biotecnológicos para la mejora de sus actividades.

BIOAGROPEC se dedica a la investigación, desarrollo, formulación y comercialización de insumos y productos para el sector agroproductivo.

Misión

Satisfacer las necesidades y cubrir con las expectativas del sector agropecuario ecuatoriano, proveyendo de opciones sustentables y aplicables mediante la elaboración de productos biológicos, bajo los mejores estándares de calidad para una mejora continua.

Visión

Ser empresa líder a nivel nacional con la mejor competitividad del mercado, dedicada al desarrollo tecnológico, formulación y comercialización de insumos y productos para el sector agropecuario.

5.2. Análisis Situacional del mercado

La superficie destinada a labores agropecuarias en Ecuador en el 2016 fue de 5,39 millones de hectáreas, el 57,53 % está destinado al cultivo de pastos, la provincia con el mayor número de hectáreas destinadas a esta actividad es Manabí con 765.625 hectáreas de pastos nativos y cultivados, como resultado alberga a la mayor población de ganado vacuno en el país (INEC, 2016). La actividad ganadera lidera con 4,13 millones de cabezas frente a otras actividades pecuarias, para el 2016 del total de cabeza de ganado el 49.48% de la producción se da en la región sierra (INEC, 2016).

La producción lechera en Ecuador alcanzó en el 2016 con 896170 vacas ordeñadas, un volumen de 5.32 millones de litros, la región sierra alcanzó 4107 miles de litros, siendo Pichincha la provincia con un mayor rendimiento, alcanzando un promedio de 10.49 litros de leche por vaca. El 72% de la producción de leche se la comercializa en líquido para su posterior industrialización (INEC, 2016).

La provincia de pichincha es la mayor productora de leche del país, representa el 15.89% del total nacional con un rendimiento de 5.94 litros/vaca por debajo del promedio nacional que es 10.49 litros/vaca. Pichincha además produce 11208 toneladas métricas de maíz al año, parte de esta cantidad se emplea para elaboración de silos y su posterior consumo como fuente de materia seca para el ganado lechero (INEC, 2016).

Mercado meta

El mercado al que se enfoca la comercialización del producto es a los productores lecheros de la provincia de pichincha que responden a 80 640 vacas con un volumen de producción total de 845 963 litros/vaca al año (INEC, 2016).

5.3. FODA

En la tabla 4 se muestran las fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas que afectan directamente al objetivo planteado por la empresa BIOAGROPEC:

Tabla 4.*Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas del producto.*

Fortalezas	Debilidades
<ol style="list-style-type: none"> 1. Materia prima de fácil adquisición, producción nacional. 2. El consorcio bacteriano al ser aislado en condiciones nativas se adapta a las condiciones climáticas del país. 3. No contiene preservantes ni agentes químicos que sean residuales en el ambiente o generen toxicidad. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Falta de recursos internos para capacitar a productores y difundir información. 2. Tiempo de vida útil del producto en estado líquido no superior a doce meses. 3. Falta de regulación y caracterización del producto por parte de entidades gubernamentales de control.
Oportunidades	Amenazas
<ol style="list-style-type: none"> 1. No hay productos de competencia que sean específicos para la fermentación de forrajes. 2. Existe restricción para la importación de microorganismos vivos para uso agrícola. 3. Existen incentivos por parte del gobierno a emprendimientos direccionados a los agro productores. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Producción y comercialización de manera informal de consorcios bacterianos no específicos empleados en la producción de silos. 2. Replicación del consorcio por parte de posibles competidores. 3. El uso del producto es temporal, de acuerdo a la producción de forrajes.

5.3.1. Estrategias FODA

En la tabla 5, se definen las estrategias FODA.

Tabla 5.
Estrategias FODA

Factores	Fortalezas	Debilidades
<p>INTERNOS</p> <p>EXTERNOS</p>	<p>Materia prima de fácil adquisición producción nacional.</p> <p>El consorcio bacteriano al ser aislado en condiciones nativas, se adapta a las condiciones climáticas del país.</p> <p>No contiene preservantes ni agentes químicos que sean residuales en el ambiente o generen toxicidad.</p>	<p>Falta de recursos internos para capacitaciones al productor.</p> <p>Tiempo de vida útil del producto en estado líquido no superior a doce meses.</p> <p>Falta de regulación y caracterización del producto por parte de entidades gubernamentales de control.</p>
Oportunidades	FO	DO
<p>No hay productos competencia que sean específicos para la fermentación de forrajes.</p> <p>Existe restricción para la importación de microorganismos vivos para uso agrícola.</p> <p>Existen incentivos por parte del gobierno a emprendimientos direccionados a los productores.</p>	<p>Emplear la marca país en las etiquetas del producto comercial.</p> <p>Formar acuerdos con entidades gubernamentales para comercialización del producto.</p> <p>Mejorar el proceso de producción.</p>	<p>Generar un plan de capacitación para la difusión de nuevas tecnologías en proceso de ensilaje.</p> <p>Estabilizar el proceso de producción para mejorar en el tiempo de utilización.</p> <p>Patentar la marca y proceso de producción.</p>
Amenazas	FA	DA
<p>Producción y comercialización de manera informal de consorcios bacterianos no específicos empleados en la producción de silos.</p> <p>Replicación del consorcio por parte de posibles competidores.</p> <p>El uso del producto es temporal, de acuerdo a la producción de forrajes.</p>	<p>Inversión para la mejora en la tecnología de producción y presentación de producto terminado.</p> <p>Ofrecer producto con garantía de elaboración.</p> <p>Promocionar las ventajas del uso del producto en procesos de ensilaje.</p>	<p>Implementar el empackado de envases al vacío.</p> <p>Producción bajo parámetros de buenas prácticas de manufactura.</p> <p>Comercializar el producto en canales de distribución masivos, para mejor accesibilidad de los productores ganaderos.</p>

5.3.2. Análisis FODA.

Análisis FO

FO 1. Gracias a la iniciativa de los emprendimientos se puede solicitar el sello de marca país para colocarlo en la etiqueta del producto en sus diferentes presentaciones, al ser un producto cuya base consiste en bacterias aisladas de

forrajes cosechados en el territorio ecuatoriano, el consorcio no tiene dificultad para su adaptación a condiciones ambientales, además no se genera una alteración de la microbiota nativa.

FO 2. Con la finalidad de mejorar las condiciones de producción de silo de los ganaderos de la sierra se facilita la vinculación con entidades gubernamentales de control para la comercialización del producto en establecimientos de fácil acceso para los productores.

FO 3. Para poder satisfacer las necesidades de los productores ganaderos que requieren al momento de la manipulación del producto, los empaques y su presentación deben reacondicionarse con diferentes volúmenes, para esto se requiere de reinversión para la mejora continua en equipos y tecnología en la propagación de un inóculo estable.

Análisis FA

FA 1. La inversión facilita el crecimiento con la adquisición de equipos y maquinaria industriales para la producción de un inoculante viable en el tiempo. De esta forma se puede modificar el tipo y tamaño de presentación, condiciones favorables para el producto gracias a las nuevas tecnologías aplicadas en la industria pecuaria.

FA 2. Manteniendo un producto bajo estándares de producción definidos, se facilita la propagación del inóculo sin alterar su composición, gracias a procesos de control de calidad se producirá el consorcio de BAL en concentraciones óptimas para su posterior aplicación en campo.

FA 3. Mediante el uso del inoculante en procesos de conservación de forrajes el ganadero asegura la inocuidad y estabilidad del producto terminado en el tiempo, las condiciones de conservación aseguran la disponibilidad de materia seca en temporadas de baja producción de forrajes evitando alterar los volúmenes de producción de leche del hato.

Análisis DO

DO 1. La difusión de la información es uno de los pilares importantes para la creación, producción y comercialización del inoculante utilizado en el ensilaje, los productores recibirán capacitaciones sobre el montaje de procesos de ensilaje y la manipulación de microorganismos que se usan como aditivos en la conservación de estos.

DO 2. El uso de silo como fuente de materia seca en la dieta del ganado vacuno es una alternativa con beneficios económicos para el productor. El uso de microorganismos debe ser versátil en el tiempo. El uso de nuevos procesos biotecnológicos mejora tiempos de almacenamiento del inóculo y disponibilidad para que el ganadero lo pueda emplear en temporadas de alta producción de forrajes.

DO 3. Los procesos biotecnológicos brindan soluciones a problemas de producción en la agroindustria es por esta razón al obtener un producto que revolucione o mejore las actividades agropecuarias debe ser patentado y protegido bajo la marca país con esto promover nuestro desarrollo productivo hasta llegar a su comercialización en mercados internacionales.

Análisis DA

DA 1. La constante evolución de la tecnología brinda una mejor aplicación de productos en la industria, es así que cambios en la forma y presentación de los productos pueden marcar una diferencia en el mercado frente a productos de la competencia, por esta razón la mejora continua en los procesos de propagación de microorganismos nos llevará a generar un producto de fácil manipulación en un volumen menor con las mejores prestaciones en campo; una de las alternativas es mejorar el método de micropropagación brindando un ambiente más controlado al consorcio de *Lactobacillus*, alcanzando una mayor población en el menor tiempo posible.

DA 2. Los parámetros de producción deben basarse en buenas prácticas de manufactura, y control de calidad bajo las normas vigentes en el Ecuador, con la finalidad de alcanzar un producto confiable al momento de su utilización.

DA 3. El producto estará al alcance de pequeños y grandes productores ganaderos, para esto se comercializará en tiendas agropecuarias. El precio garantiza la factibilidad de acceso acorde a la demanda y volumen de compra.

5.4. Marketing Mix

5.4.1. Producto

5.4.1.1. Descripción del producto

El producto que se ofrece es un consorcio de tres bacterias específicas del género de *Lactobacillus*: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus collinoides*. Es un producto líquido de fácil uso y aplicación. No es tóxico para el ser humano o medio ambiente, ya que no contiene preservantes sintéticos con potencial efecto tóxico y es un consorcio libre de patógenos microbianos.

El producto se utiliza como un aditivo en el proceso de ensilaje con el objetivo de fermentar y preservar los forrajes, lo cual significa que la caracterización de un consorcio estable de *Lactobacillus* BAL podría optimizar la operación y rendimiento de sistemas de producción animal (Zambrano, 2013).

El producto tiene como finalidad acelerar el proceso de fermentación de los carbohidratos solubles presentes en el forraje por medio de bacterias especializadas en la producción de ácido láctico en condiciones anaerobias, de esta manera se conserva el alimento ya que la acidificación del medio inhibe el desarrollo de microorganismo indeseables (levaduras, hongos, enterobacterias).

La demanda está en función del aumento de la producción por parte de los agricultores y de la capacidad de compra de los consumidores.

Actualmente en el mercado no existen productos que contengan consorcios de microorganismos nativos específicos para el proceso de ensilaje, existen productos a base de microorganismos benéficos sin ser claramente identificados.

Por ser un producto líquido su manipulación es sencilla, es de muy fácil aplicación en la práctica, se puede aplicar incluso en la misma operación de picado del material a ensilar (figura 34).



Figura 34. Aplicación de consorcio de *Lactobacillus* en ensilaje de maíz.

5.4.1.2. Nombre del producto

El nombre seleccionado para el producto fue “SILOLAC”, este nombre se lo eligió con el objetivo que esta nueva marca ocupe un lugar claro y apreciado en la mente de los consumidores que constituyen el segmento de mercado objetivo, además de conseguir que las percepciones, impresiones y sentimientos de los consumidores sean asociados entre el producto y el proceso para el cual fue creado.

Presentaciones

El producto a base de BAL, se maneja en varias presentaciones, con el fin de adecuarse a las necesidades de los consumidores, al igual que a sus metodologías de ensilado y también a la capacidad de compra de los clientes y consumidores, las presentaciones son:

Envase de 1000 mL: Esta presentación se adecúa principalmente a los pequeños ganaderos que realizan un proceso de ensilaje en bolsas de 45 kg (figura 35).



Figura 35. Presentación de 1 litro del producto SILOLAC.

Envase de 4 litros: Esta presentación es direccionada a ganaderos que realizan una mayor cantidad de silo, proceso de ensilaje principalmente en trincheras (figura 36).



Figura 36 Presentación de 4 litros de SILOLAC.

Envase de 20 litros (caneca): Esta presentación es de gran economía para el cliente debido a que permite mayor cantidad de producto por un precio menor, esta presentación esta direccionada para los grandes productores de silo (mayor a 20 toneladas) (figura 37).



Figura 37 Presentación caneca de 20 litros de SILOLAC.

Etiqueta

La etiqueta está diseñada en base a la norma INEN 221:1997, en donde se establecen los requisitos que deben cumplir las etiquetas de los envases de fertilizante o abonos. No existe una normativa específica para el etiquetado de productos biológicos.

Para todas las presentaciones se cuenta con dos etiquetas, una en la parte delantera del envase y otra en la parte posterior.

En la etiqueta que se ubica en la parte delantera se encontrará el nombre comercial del producto, la fórmula con la concentración en unidades formadoras de colonias del consorcio por cada mililitro del producto, una frase resumen del objetivo de uso del producto, el contenido neto y el logotipo de la empresa fabricante (figura 38).



Figura 38. Diseño de etiqueta frontal

La etiqueta ubicada en la parte posterior contendrá indicaciones relativas al modo de empleo, instrucciones de uso, precauciones, compatibilidad con otros productos, fecha de formulación, fecha de vencimiento, número de registro de Agrocalidad, número de lote, y la leyenda: “Para mayor información consulte con el técnico profesional” (figura 39).

LEA ESTA ETIQUETA ANTES DE USAR EL PRODUCTO	
<p>MODO DE ACCIÓN SiloLAC contiene microorganismos biológicamente activos seleccionados que ayudan a una rápida fermentación.</p> <ul style="list-style-type: none"> Desplaza patógenos y mejoran la calidad del silo. Incrementa la velocidad en la caída de pH. 	<p>TOXICIDAD SiloLAC es seguro de usar, no es tóxico, no es corrosivo, no produce vapores/humos. Pese a que carece de toxicidad intrínseca para humanos y animales, es necesario evitar la ingestión y posible contaminación de alimentos. La ingestión de este producto puede ocasionar trastornos gastrointestinales.</p> <p>Ojos: No causa irritación. Piel: No causa irritación o quemaduras. Inhalación: No causa irritación.</p>
<p>INSTRUCCIONES DE USO Y DOSIS A una dosis de 250 cc/Tm. SiloLAC, debe aplicarse por aspersión directamente al material a fermentar, máximo hasta 24 horas después de su preparación. Agite antes de usar.</p>	<p>INSTRUCCIONES PARA PRIMEROS AUXILIOS Contacto con los ojos: Lavar con abundante agua. Contacto con la piel: Lavar con abundante agua y jabón. Inhalación: No causa irritación. Ingestión: Preferiblemente inducir al vómito puede ocasionar trastornos gastrointestinales.</p>
<p>ESTABILIDAD El producto permanece estable durante 90 días bajo condiciones de almacenamiento y manejo establecidos. SiloLAC mantiene sus características sin alterarse. Biodegradable.</p>	<p>ELIMINACIÓN DEL ENVASE Una vez vaciado el contenido del envase, enjuáguelo tres veces, vertiendo el residuo al estanque de la maquinaria de aplicación.</p>
<p>PRECAUCIONES SiloLAC por ser un complejo biológicamente activo, debe mantenerse fuera de la exposición solar directa y de temperaturas superiores a 20°C. Cuando no se utilice la totalidad del producto cierre de inmediato el envase para evitar la contaminación.</p>	
<p>MANEJO DE FUGAS O DERRAMES Colocar solución de hipoclorito de calcio al 3% sobre el producto derramado y dejar actuar durante 30 minutos. Lavar con abundante agua.</p>	
<p>PARA MAYOR INFORMACIÓN CONSULTE CON EL TÉCNICO PROFESIONAL</p>	

Figura 39. Diseño de etiqueta posterior

5.4.2. Precio

Ya que no existen productos iguales en el mercado para realizar el cálculo del precio de acuerdo a la competencia, la empresa BIOAGROPEC definió el precio

mediante un incremento sobre su costo total de producción, es decir, añadió un porcentaje de aproximadamente el 75% sobre el costo neto, con lo cual le permite mantener un margen de ganancia y solventar sus gastos fijos, así como tener una utilidad lo suficientemente rentable para mantenerse en tiempo bajos de ventas.

Es importante hacer mención que por políticas de la empresa y el compromiso de confidencialidad mantenido como parte de la factibilidad de acceso a la planta y al proceso de producción no se pueden especificar los costos específicos de cada partida, por lo que sólo hizo mención general de ellas.

En la tabla 7, se muestra los precios netos del producto SILOLAC.

Tabla 7.
Precio de SILOLAC de acuerdo a sus presentaciones

Presentación	Precio
1 litro	\$ 14
4 litros	\$ 55
20 litros	\$ 265

5.4.2.1. Estrategia de precio

El precio del producto incluye asistencia técnica, capacitación y seguimiento durante el proceso de ensilaje.

Se planteó una estrategia de descuento del 5% al 10%, de acuerdo con el consumo del producto (tabla 8).

Tabla 8.*Porcentajes de descuentos en base a la cantidad de producto pedido.*

Cantidad	Descuento
De 250 a 500 litros	5%
Mayor a 500 litros	10%

5.4.3. Plaza

BIOAGROPEC utilizó un canal de distribución directo, el cual aplica un esquema de venta directa al consumidor final, este canal es el más simple debido a que no incluye ningún tipo de intermediarios.

De igual forma, maneja el marketing multinivel, a través del cual se tiene la ventaja de ofrecer los productos al consumidor final, utilizando distribuidores que obtienen rentabilidad de acuerdo al volumen de sus ventas.

La empresa tiene contacto directo con los consumidores, debido a que ofrece y suministra sus productos a través de ventas por pedido y servicio a domicilio a las haciendas ganaderas.

En este tipo de canal, el fabricante desempeña las funciones de mercadeo, como publicidad, comercialización, transporte, almacenamiento.

5.4.4. Promoción

Para plantear las estrategias de la mezcla promocional, se desarrollaron 3 de los tipos de comunicación de marketing, con el fin de dar a conocer el producto, incentivar a los consumidores a la compra y a su vez crear lealtad de marca. Así mismo, el propósito principal de la promoción es informar a los compradores potenciales, persuadirlos y recordarles la existencia de la empresa y sus productos.

El objetivo de todas las actividades de promoción será el posicionamiento del producto en el mercado; para ello, nos enfocaremos en difundir las características del SILOLAC resaltando que es un producto ecuatoriano de calidad y único.

La mezcla promocional puede dirigirse tanto a los intermediarios (clientes directos) como al consumidor final, por lo tanto, se plantea que la empresa BIOAGROPEC se enfoque principalmente en una “estrategia de jalar”, que consiste en desarrollar las actividades de marketing orientadas a impulsar la compra del inoculante SILOLAC por el consumidor final.

5.4.4.1. Venta personal

La venta personal es una estrategia por medio de la cual se presenta una comunicación directa de la información, con el propósito de persuadir al cliente y convencerlo de realizar la compra.

Este tipo de comunicación resulta más flexible y eficiente que herramientas como la publicidad, teniendo en cuenta que los vendedores pueden preparar sus técnicas de ventas de acuerdo a las necesidades de cada cliente y garantizar el cierre de la compra del producto exitosamente.

La propuesta para la empresa BIOAGROPEC es utilizar el tipo de venta personal, conocido como venta externa, a través del cual los vendedores visitan al cliente directamente en las haciendas o se ponen en contacto con ellos (figura 40).

La estrategia consiste en contratar mediante vinculación laboral dos vendedores, que logren abarcar la totalidad de la población objetivo, para lograr esto, se plantea programar un promedio de tres visitas diarias por vendedor de lunes a viernes, es decir, cada uno realizará semanalmente 15 visitas a los clientes.

La empresa debe manejar una estructura de la fuerza de ventas de tipo asignación de clientes, donde cada vendedor se encargará de un número específico de clientes, lo cual es de gran ventaja porque el vendedor logra conocer profundamente al cliente y a su vez crear un lazo de confianza entre ellos.

Es necesario capacitar a los vendedores en los siguientes aspectos para que su gestión sea efectiva: conocimiento acerca de la empresa, producto, clientes, así mismo, prepararlo sobre técnicas de venta y organización del trabajo y distribución del tiempo.



Figura 40. Venta directa a los consumidores.

5.4.4.2. Publicidad

El tipo de publicidad a utilizar puede considerarse una publicidad de demanda primaria, esta es ideal cuando el producto se encuentra en las primeras etapas del ciclo de vida y se busca estimular la demanda de éste, inicialmente se centra en informar acerca del producto, con el fin de que el consumidor lo reconozca, y posteriormente le interese adquirirlo.

- **Medios digitales**

Se realizaron promociones a través de las redes sociales ya que actualmente son una herramienta con fuerte impacto. Se publicaron fotos del proceso de ensilaje, imágenes del producto y beneficios para que el consumidor note la calidad del producto.

La herramienta que se utiliza es Facebook, a través de este medio se logró la captación masiva de clientes y el segmento de mercado objetivo. La página oficial de Facebook brinda facilidades para promocionar el producto a los usuarios que la sigan o la visiten; en ella se publican fotografías publicitarias tanto del producto, así como también fotografías de los productores (mientras elaboran el producto); además de los acontecimientos importantes que sirven como oportunidad de consumir el producto (figura 41).

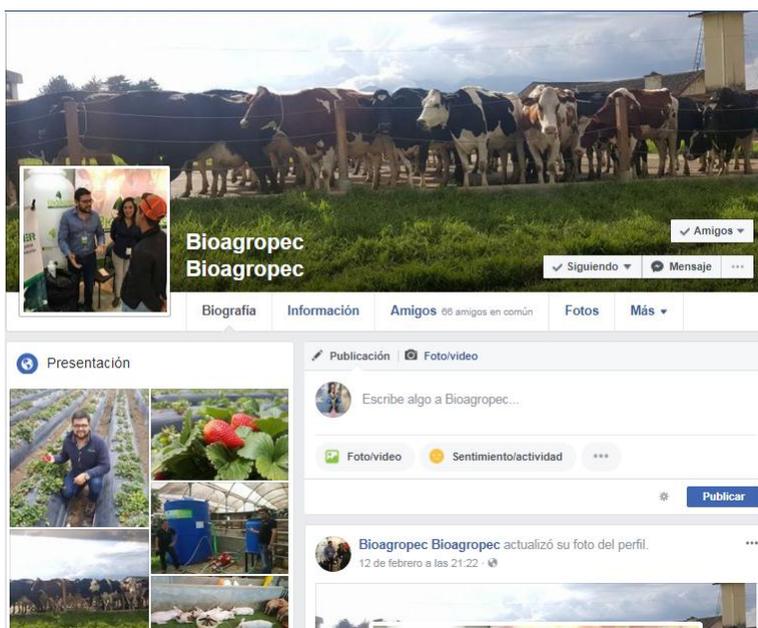


Figura 41. Utilización de Facebook como medio digital para publicidad.

- **Participación en ferias**

Las Ferias y Exposiciones permiten establecer contacto con un gran número de clientes actuales o potenciales en un período de tiempo y espacio muy corto.

La empresa BIOAGROPEC participa en ferias ganaderas realizadas dentro y fuera de la provincia de Pichincha para fomentar su desarrollo.

En estas ferias una táctica importante fue la entrega de material promocional, con el cual se dio a conocer más información del producto, sus ventajas, beneficios y sobre todo el contacto de la empresa BIOAGROPEC para incrementar la lista de clientes.

El material de promoción para comenzar a posicionar tanto la empresa como la marca, serán esferos, volantes, publicidad de la marca en arañas, banking, etc (figura 42).



Figura 42. Participación en ferias y material promocional.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

El sistema de ensilado tiene factibilidad práctica en el país debido a que los forrajes son escasos y están regidos a períodos cíclicos dependientes de los fenómenos naturales y la época del año. El diseño de este estudio permitió aislar y caracterizar tres especies de *Lactobacillus* a partir de forrajes nativos (maíz, cebada y avena), para formar un consorcio. En general los *Lactobacillus* pueden ser aislados de fuentes diversas de cultivo o muestras biológicas que incluyen los vegetales, fuentes alimenticias como la carne o los lácteos y el tracto gastrointestinal de los mamíferos. La colonización en este último está relacionada con la ingesta previa del microorganismo que es microbiota natural de las fuentes de nutrientes (Siezen, y otros, 2010). En este estudio, las cepas de *Lactobacillus* fueron aisladas de piques al azar a partir del cultivo en MRS, por lo que los forrajes utilizados constituyen una fuente valiosa de bacterias benéficas nativas, lo cual es descrito también por múltiples autores como De Man, Rogosa, & Sharpe en 1960.

El aislamiento de *Lactobacillus plantarum* nativo es relevante por su elevada resistencia al ambiente acidófilo, sus propiedades antioxidantes y antibacterianas son probablemente responsables de gran parte del éxito del consorcio determinado en este estudio (Kaushik, *et al*, 2009).

La cinética de crecimiento del consorcio microbiano en el medio de cultivo C2 fue considerada para el diseño e implantación del biorreactor. En la cinética se observó la ausencia de fase de latencia dado que el inóculo fue una mezcla de las tres cepas de *Lactobacillus* en condiciones de fase logarítmica de crecimiento en óptimas condiciones de incubación a 35°C y en ambiente microaerofílico con lo que se consiguió la continuidad del crecimiento de las bacterias.

Comparando los medios de cultivo utilizados como sustratos en el ensayo de cinética se observa una diferencia del crecimiento hacia la hora 40. Esto se puede explicar por el contenido de peptonas en la formulación del medio industrial como en el estudio de Basaran E., (2004) quien demostró que las peptonas provenientes de restos de carne son un mejor sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus casei* de hasta un 30% mayor que con triptona y con una consecuente mejora en la producción de ácido láctico (Basaran, 2004).

Para la propagación semi-industrial de microorganismos productores de ácido láctico, con el objetivo de reducir los tiempos de replicación de las cepas y de minimizar la contaminación del proceso, para esto se tomó en cuenta la cinética de crecimiento del consorcio, datos obtenidos en condiciones controladas y llevadas a un equipo de 200 litros de capacidad, en base a las condiciones ambientales el tiempo de fermentación anaerobio para alcanzar una población de 1×10^9 UFC/mL fue de 48 horas Este rendimiento es mejor que el establecido por James M (2016), quien estableció el rendimiento del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en inulina como fuente de carbono (James, 2016).

El sistema de recirculación en el biorreactor fue impulsado por una bomba de caudal de 80 l/min y una potencia de 0.5 HP; se empleó este equipo para evitar incrementos en la presión del fluido al interior de las tuberías de conexión entre el tanque y la bomba, obteniendo un flujo laminar que evita lisis celular y garantiza la homogeneidad de las concentraciones microbiológicas y de sustrato en todos los puntos del sistema.

Para el inóculo inicial se determinó un volumen de 24 litros para la carga al biorreactor a una concentración mínima de 1×10^5 UFC/mL de cada una de las cepas identificadas, garantizando la estabilidad en la etapa de latencia del consorcio, hidrolizando los sustratos presentes en el medio industrial y disminuyendo tiempos de operación.

Se seleccionó el medio óptimo basado en 5,05% proteínas vegetales, 5,53% carbohidratos solubles (melaza) y 89,42% humedad. para el mantenimiento del consorcio; como indica Brantes, 2011, al modificar las concentraciones de carbohidratos y nitrógeno se puede alcanzar un rendimiento superior y a menor costo, comparado al obtenido con medios de cultivo convencionales como MRS o melaza.

Al recopilar información de ganaderos lecheros de la provincia de Pichincha responsables del 15% de la producción total de leche del país según INEC, 2016. Se seleccionó a 195 de los 23278 productores de la provincia, para realizar una encuesta donde el 96,92% está dispuesto a emplear microorganismos productores de ácido láctico como agentes de fermentación y conservación de sus forrajes al momento de la elaboración de los silos, además que el 64.1% de los encuestados han elaborado silo en sus instalaciones, es así que el 33.85% del total de los productores lecheros

han empleado en la dieta diaria silo, de estos un 62.05% lo han elaborado con maíz como fuente de materia seca. La práctica de administración de silo como alimento en el ganado no es nueva, incluso el ministerio de agricultura otorgó facilidades de acceso a silo en los productores Lojanos en épocas en las que el clima no favoreció el cultivo de forrajes (Sanchez, 2014). De igual forma en Chile, existen importantes esfuerzos para garantizar el acceso a silo de forrajes diversos, incluyendo alfalfa para el consumo de los bovinos (Cádenas, 2011)

De los productores de la provincia de Pichincha que elaboran silo, el 68.21% consideran que el uso de inoculantes mejora la conservación de su silo por su fácil manejo ya que manifiestan que el uso de este tipo de aditivos líquidos mejora la dispersión al momento de la aplicación, mejorando la inoculación de los microorganismos entrando en contacto con todas las partículas del material a fermentar.

Determinado el mercado meta que es el catón Mejía de la provincia de Pichincha, se consideró que el producto terminado puede ser empleado como materia prima en la elaboración de silos de gramíneas, se seleccionaron tres presentaciones para su comercialización en 1, 4 y 20 litros. Los precios de venta en función de los costos de producción son: 14, 55 y 265 dólares americanos respectivamente.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Las cepas asiladas, identificadas y propagadas corresponden a bacterias capaces de fermentar carbohidratos y producir ácido láctico con gran eficiencia, estas fueron; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus collinides*.

Se diseñó y construyó el biorreactor de acuerdo con los parámetros de diseño planteados en base a la cinética de crecimiento y la formulación del sustrato y condiciones de mezcla controladas.

La agitación intermitente facilitó la homogeneidad de las concentraciones del sustrato y biomasa al interior del biorreactor.

El diseño inicial del biorreactor planteó un sistema cerrado sin intercambio de gases con el exterior, lo que garantizó la anaerobiosis en el proceso de fermentación y propagación adecuada del consorcio.

El funcionamiento del biorreactor alcanzó a las 48 horas de fermentación una concentración final del inóculo de 1×10^9 UFC/mL y un pH de 4 en el medio.

Se escogió a la provincia de Pichincha como sitio de estudio debido a que es el responsable de la producción del 15% del total de leche del país, con un total de 896170 cabezas de ganado ordeñadas al año, siendo un potencial mercado para la comercialización de SILOLAC, empleándolo como aditivo en la fermentación de silos.

De 23287 productores de leche de la provincia, se seleccionó a 195 para ser encuestados, se escogió a productores del cantón Mejía, del total de los encuestados el 96.92% están dispuestos a emplear nuevas tecnologías para la conservación de

silos de gramíneas, considerando que no hay una difusión acerca de la metodología de producción de suplementos alimenticios, tan solo el 64,1% de la población elabora silos, siendo un nicho adecuado para el desarrollo del producto y posterior comercialización.

Para promover la venta del producto se emplearon canales audiovisuales para su publicidad, el uso de redes sociales facilitó la difusión de información técnica, resultados obtenidos con el uso del producto, así como también los precios y promociones para la comercialización.

CAPÍTULO 8

RECOMENDACIONES

Llevar un control de calidad del consocio obtenido en el biorreactor, para garantizar las poblaciones de microorganismos de interés, descartar posibles contaminaciones por patógenos, como es el caso de mohos, levaduras o coliformes.

Tomar en cuenta los tiempos de operación en el sistema de recirculación para evitar taponamientos en las tuberías por formación de biopelículas y daños por sobrecargas de energía en la bomba, incrementando el tiempo de vida útil del equipo.

Se sugiere a la empresa implementar para sus vendedores una entrevista consultiva, mediante la cual se busca investigar y profundizar en las necesidades específicas del consumidor, los principales problemas o dudas que se presentan respecto al producto, logrando que ambos trabajen en equipo y orientar al cliente a la toma de una decisión sobre la compra del producto, con el fin de llegar a una negociación exitosa. Igualmente, los vendedores deberán realizar un reporte de actividades diario, donde incluyan información acerca de los clientes visitados, valor de los pedidos, problemas presentados en general y contactos a nuevos clientes.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

- Aznar, R., & Zúñiga, M. (2011). ¿Qué son las bacterias Lácticas? *Redbal*.
- Bedon, L. (2017). Proceso técnico de ensilado. (Q. ME, Entrevistador)
- Bota, A. (2003). El impacto de la biotecnología en América Latina espacios de la participación social. *Acta Bioética, año IX*.
- CEDECAP. (2007). Biodigestor de polietileno: Construcción y diseño. *Cedecap*.
- Chiriboga, O. (2010). Desarrollo de procesos de producción de biogás y fertilizante orgánico a partir de mezclas de desechos de procesadoras de frutas. Universidad San Francisco de Quito.
- Cobos, M. (2007). Técnicas de ensilaje y construcción de silos forrajeros. *SAGARPA*.
- Contreras, F., Marsalis, M., & Lauriault, L. (s/a). Inoculantes microbiales para ensilaje: Su uso en condiciones de clima cálido. *Circular. Facultad de Ciencias Agrícolas, Ambientales y del Consumidor*.
- Cubero, J., Rojas, A., & WingChing, R. (2010). Uso del inóculo microbio elaborado en finca en ensilaje de maíz (*Zea maiz*. *Agronomía Costaricense*, 237-250.
- Custodio, L., Morais, G., Daniel, J., & Pauly, T. N. (2016). Effects of chemical and microbial additives on clostridium development in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) ensiled with lime. *Grassland Science*.
- De Man, J., Rogosa, M., & Sharpe, M. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*.
- DEPROSUR. (2017). *El Productor*. Obtenido de <https://elproductor.com/articulos-tecnicos/articulos-tecnicos-salud-animal/alimentacion-del-ganado-y-sistemas-de-pastoreo/>
- Diaz, B. (2014). *Repositorio Digital Senescyt*. Obtenido de Repositorio Digital Senescyt: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/3631/1/T-SENESCYT-01410.pdf>

- Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (2006). *Microbiología Industrial*. Washington, DC.: Sscience.
- Fernández, R. (2007). *Manual para elaborar un Plan de Mercadotecnia*. Distrito Federal, México: McGraw Hill.
- Ferrell, O., & Hartline, M. (2006). *Estrategia de Marketing*. Distrito Federal, México: Thomson Learning.
- Galindo, J., Muñoz, E., Marrero, Y., Gonzalez, N., & Sosa, A. (2017). Activadores ruminales, aspectos generales y sus ventajas en la alimentación de animales rumiantes. *Cuban journal of Agricultural Science*.
- Garces Molina, A. M., Berrio Roa, L., Ruiz Alzate, S., Serna de León, J., & Builes Arango, A. F. (2008). Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. *Revista Lasallista de investigación*.
- Garcés, A., Berrio, L., Ruiz, S., Serna, J., & Builes, A. (s.f.). Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. *Revista Lasallista de investigación*, 57-67.
- Guadalupe, A. R. (2013). Plan de Comercialización.
- Guerrero, A., Sumba, E., & Salvador, S. (2014). Productividad agrícola en el Ecuador. Ecuador.
- Hofvenahl, K., & Hahn-Hagerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and microbial Technology*.
- IDEA. (2007). Biomasa: Digestores anaerobios. Madrid, España: Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía.
- INEC. (2016). Instituto Nacional de Estadística y Censo.
- Karaj, S., Rehl, T., & Muller, T. (2009). Analysis of biomass residues potential for electrical energy generation in Albania. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 493 - 499.
- Klein, F. (1994). Utilización de ensilaje de maíz en producción de leche. *Boletín técnico Inia Remehue*, 1-17.
- Kotler, P., & Armstrong, G. (2008). *Fundamentos de Marketing*. Distrito Federal, México: Editorial Pearson.

- Kotzamanidis, C., Roukas, T., & Skaracis, G. (2002). Optimization of lactic acid production from beet molasses to lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Lamb, C., Hair, J., & McDaniel, J. (2002). *Marketing*. Distrito federal, México: Thomson.
- Lerma, A. (2010). *Desarrollo de nuevos productos: una visión integral*. Distrito Federal, México: Cengage Learning.
- Limsowtin, G., Broome, C., & Powell, I. (2003). Lactic acid bacteria taxonomy. En *Encyclopedia of dairy sciences*. London: In H. Roginski, J. W. Fuqualy, eP. F. Fox(eds).
- Loján, M. (2017). *Repositorio Digital, UTA*. Obtenido de Efecto de un probiótico natural sobre la producción y calidad de la leche en bovinos (*Bos taurus*): <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/25089>
- LORSA. (2010). *Ley Orgánica de Régimen y Soberanía Alimentaria*. Obtenido de <http://www.soberaniaalimentaria.gob.ec/pacha/wpcontent/uploads/2011/04/LORSA.pdf>
- Mitchell, D., Von Meien, O., & Krieger, N. (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bio-reactors. *Biochemical Engineering Journal*, 137 - 147.
- Moncalvo, A. (2007). *Administración de negocios digitales*. Obtenido de <http://books.google.com.ec/books?id=qX5EvOnONAYC&pg=PA19&dq=desarrollo+de+marcas&hl=es-419&sa=X&ei=GfD7ULD8CIPk9AT9ioCIBA&ved=0CDUQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false>
- Moncayo, G. (2008). Dimensionamiento, diseño y construcción de biodigestores y plantas de biogás. *Aqualimpi Beratende ingenieure*, 607 - 608.
- Muck, R., & Contreras, F. (2006). Inoculantes Microbiales para ensilaje. *Focus on Forage*.
- Nair, P., & Suprendran, P. (2005). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. *Journal of Culture Collection*.
- Ocanto, G., Acevedo, I., & García, O. (2014). Evaluación de las características fisicoquímicas y funcionales del ensilaje de maíz (*Zea mays*) y ensilaje de sorgo (*Sorghum vulgare*). Venezuela.

- Ogunade, I., Kim, D., Jiang, Y., Weinberg, Z., Jeong, K., & Adesogan, A. (2016). Control of *Escherichia coli* O157:H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. *Journal of Dairy Science*.
- Parra, R. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel Funcional en los alimentos. *Facultad de ciencias Agropecuarias*.
- Patty-Quispe, M., Loza, M., Achu, C., Rojas, A., Chura, F., & Quispe, C. (2017). Evaluación del efecto de suplemento de heno fortificado y concentrado en la producción de leche de bovinos (*Bos taurus* L.) durante la época seca en la comunidad de Achaca-Tiahuanacu. *Journal of the selva Andina Animal Science*, 13-37.
- Pérez, L. (2004). *Marketing social: Teoría y Práctica*. Monterrey, México: Pearson.
- Pérez, L., Calero, R., & Hernández, R. (2012). *Geomarketing: Marketing territorial para vender mas y fidelizar más*. Madrid, España: ESIC.
- Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Fuente*.
- Rodríguez de Stouvenel, A., & Sena, L. (2005). Producción Biotecnológica de ácido láctico: Estado del Arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*.
- Ruiz, H. (2004). *Desarrollo de un bioproceso para la producción de pectinasa fúngica en medio sólido utilizando pomaza de limón*. Saltillo, Coahuila.
- Sáenz, T. A., & Ramos Gorbeña, J. C. (2008). Bacterias ácido lácticas: Biopreservación de los alimentos. *Biotiempo*.
- Salamanca, J. (2009). Diseño, construcción y puesta en marcha de un biodigestor a escala piloto para la generación de biogás y fertilizante orgánico. Universidad San Francisco de Quito.
- Santer, M. (2010). Joseph Lister: first use a bacterium as a "model organism" to illustrate the cause of infectious disease of humans. *The royal society journal of the history of science*.
- Serna-Cock, L., & Rodriguez, A. (2005). Biotechnological production of Lactic Acid: State of the art. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 54-65.
- Stanton, W., Etzel, M., & Walker, B. (2007). *Fundamentos de Marketing*. Distrito Federal, México: McGraw Hill.

- Taípe, M. (2009). *Diagnóstico del Estado del Arte de la agrobiotecnología en el Ecuador*. Quito: INIAP.
- Tobía, C., Rojas, A., Villalobos, E., Soto, H., & Uribe, L. (julio-diciembre de 2004). Sustitución parcial del alimento balanceado por ensilaje de soya y su efecto en la producción y calidad de la leche de vaca, en el trópico húmedo de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, págs. 27-35.
- Ulloa, J. A., Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., & Arce, F. (2011). Bacteria lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *ISSN*.
- Villa, A. (2008). Estudio microbiológico y calidad nutricional de ensilaje de maíz cosechado en dos ecorregiones de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Walker, O., Boyd, H., Mullins, J., & Larréché, J. (2005). *Marketing Estratégico: Enfoque de toma de decisiones*. Distrito Federal, México: Editorial Interamericana Editores S.A.
- Waters, W. (1993). El desarrollo de las agroexportaciones en el Ecuador: la primera respuesta empresarial. Ecuador.
- Zambrano, J. (2013). *REpositorio Digital universidad Técnica Estatal de Quevedo*. Obtenido de Efecto de la aplicación de inoculantes bacterianos en la fermentación de ensilados de maíz (*Zea mays* L.) Finca la María, Mocache 2013: <https://secure.arkund.com/view/document/10311185-351574-468396/download>
- Zhou, S., Shanmugam, K., Yomano, L., & Grabar, T. (2006). Fermentation of 12%(w/v) glucose to 1.2M using minerals.
- Zuluaga, F. (2013). Algunas aplicaciones del ácido poli-L-Láctico. *Revista de la academia colombiana de ciencias exactas físicas y naturales*.