



CONTRIBUCIÓN DE LA LÓGICA DIFUSA EN LA PRODUCCIÓN EFICIENTE, EFICAZ Y EFECTIVA DE LEVADURAS DEL GÉNERO

Saccharomyces boulardii



feduez
Fundación Editorial
Universidad Ezequiel Zamora

Llelysmar Crespo

Contribución de la lógica difusa en la producción eficiente, eficaz y efectiva de
levaduras del género
Saccharomyces Boulardii

© Dra. Llelysmar Crespo
Mayo de 2023

Reservados todos los derechos

ISBN: 978-980-248-328-0
Depósito Legal: CO2025000001

ISBN: 978-980-248-328-0




UNELLEZ
Universidad Nacional Experimental
de los Llanos Occidentales «Ezequiel Zamora»
La Universidad que Siembra

AUTORIDADES DE LA UNELLEZ

MSc. Adam Chávez
RECTOR DE LA UNELLEZ

MSc. María Fernanda Fernández
VICERRECTOR DE SERVICIOS

MSc. Joel Raúl Moreno
SECRETARIO GENERAL

Dra. Dalia González
VICERRECTOR DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO SOCIAL
Barinas, estado Barinas

Dr. Luis Rosales
VICERRECTOR DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
Guanare, estado Portuguesa

Dra. Marielida del Carmen Rodríguez
VICERRECTOR DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO REGIONAL
San Fernando de Apure, estado Apure

MSc. Tania Sandoval
VICERRECTOR DE INFRAESTRUCTURA Y PROCESOS INDUSTRIALES.
San Carlos, estado Cojedes

Dr. Nelson Castillo
DIRECCIÓN DE INNOVACIÓN CURRICULAR
Barinas, estado Barinas

Dra. Yasmings Méndez
DIRECTORA DE CREACIÓN INTELECTUAL
Barinas, estado Barinas

Dra. María Carrillo
DIRECTORA DE ESTUDIOS AVANZADOS
Barinas, estado Barinas

AUTORIDADES DE LA UNELLEZ / VIPI

MSc. Tania Sandoval
VICERRECTOR DE AREA (E)

Dra. Yarith Navarro
JEFA DEL PROGRAMA DE ESTUDIOS AVANZADOS

MSc. Eleadys Quiñones
JEFA DEL PROGRAMA CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

MSc. Patricia Rojas
JEFA DEL PROGRAMA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR

Dr. Reynaldo Mujica
JEFA DEL PROGRAMA CIENCIAS SOCIALES Y ECONÓMICAS

Dra. Andrea Meléndez
JEFE DEL PROGRAMA CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN Y HUMANIDADES

MSc. Ángela Rendo
JEFA DEL PROGRAMA CIENCIAS JURÍDICAS Y POLÍTICAS

Dra. Gheila Peralta
JEFA DEL PROGRAMA CIENCIAS DE LA SALUD

Lcdo. Rafael Franco
SUB-GERENTE DE PUBLICACIONES COJEDES

Dra. Llelysmar Crespo
JEFE DEL PROGRAMA DE INNOVACIÓN CURRICULAR

Dr. Antonio Flores Díaz
JEFE DEL PROGRAMA DE CREACIÓN INTELECTUAL

Dra. Inirida Loreto
JEFA DEL PROGRAMA DE VINCULACIÓN SOCIO-COMUNITARIA

Dra. Evelyn Velásquez
JEFE DEL PROGRAMA TERRITORIALIZACIÓN Y MUNICIPALIZACIÓN

Dr. William Zambrano
SECRETARIO DEL CONSEJO ACADÉMICO

DEDICATORIA

En la vida todos tenemos sueños. Unos son realistas y alcanzables, otros no. Pero cuando nuestro sueño tiene un propósito y logra trascender fronteras tan novedosas como las del conocimiento, no queda mas que enfocarse, esforzarse y perseverar, con el firme objetivo de conquistar la meta, porque no estamos solos y escrito está en el libro más antiguo del mundo ***“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes porque Jehová tu Dios estará contigo en donde quiera que vayas” Josué 1:9***

En tal sentido, dedico este gran triunfo lleno de alegrías, de altos y bajos, de horas de traspaso en primer lugar:

A **Dios**, mi padre eterno por su amor incomparable, que no se agota, por ser ese motivo de inspiración y fuerza para continuar, por enseñarme que sus bendiciones me alcanzan cada día.

A **Mis Padres**, por ser pilares fundamentales en mi vida, quienes con cariño me enseñaron que con paciencia, constancia y sacrificio se pueden hacer realidad los sueños....Ha sido un privilegio ser su hija.

A **Mi Esposo**, por ser el complemento que le da razón a mi vida, por caminar a mi lado en la búsqueda del conocimiento sin dudar del éxito que alcanzaríamos.

A **Mis hijas Valentina, Valeria y Victoria**, porque su amor es el combustible perfecto que me motiva a trabajar fuertemente e ir firme siempre en el objetivo de alcanzar las metas.

A **Mis Hermanas Reina, Carla y Antonietta**, por estar siempre presentes brindándome ese apoyo moral significativo para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer.

A **Mi Tía Hilaria**, por sus consejos y palabras de aliento que siempre me animaron a luchar por mis sueños.

A **Mi Suegra**, por brindarme sus buenos consejos que me motivaron a continuar y no ceder cuando se presentaba alguna dificultad.

A **Mi Amigo y compañero de trabajo Prof. Enrique Ávila**, por su ayuda incondicional, por los valiosos conocimientos aportados.

“Nunca rompas el silencio si no es para mejorarlo”
Ludwig van Beethoven

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
 CAPÍTULO I: EL PROBLEMA.....	 4
Planteamiento del problema.....	4
Objetivos de la investigación.....	13
General.....	13
Específicos.....	13
Definición de las variables.....	13
Justificación e importancia.....	16
Alcances.....	19
 CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	 21
Antecedentes.....	21
Bases Teóricas.....	25
Biorreactores.....	25
Clasificación de los biorreactores.....	26
Biorreactores y tipos de cultivo.....	27
Levaduras.....	30
Formas y Farmacocinética.....	32
Mecanismos de acción de <i>S. boulardii</i>	34
Ciclo de crecimiento de cultivos microbianos.....	35
Control de cultivos semicontínuos en biorreactores.....	37
Lactosuero.....	38

Proceso de obtención del suero de leche.....	39
Clasificación del lactosuero.....	40
Nutrientes del suero de leche.....	42
Utilización del suero.....	43
Importancia de las proteínas del lactosuero.....	44
Aplicaciones.....	46
Lógica difusa.....	47
Sistemas de inferencias difusas.....	52
Control difuso.....	56
Eficiencia.....	59
Eficacia.....	60
Efectividad.....	61
 CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	 62
Enfoque Epistemológico.....	62
Tipo y diseño de la investigación.....	64
Tipo de investigación.....	64
Diseño de la investigación.....	64
Unidad de investigación, población y muestra.....	67
Unidad de investigación.....	67
Población.....	68
Muestra.....	68
Técnicas e instrumentos recolección de datos.....	69
Validez y confiabilidad de los instrumentos.....	71
Validez.....	71
Confiabilidad.....	72
Técnicas de procesamiento y análisis de la información.....	72
Procedimiento.....	74

CAPÍTULO IV: RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	79
Caracterización de la infraestructura tecnológica del sistema de producción de levaduras.....	79
Experimentación para la producción semicontinua de levaduras del género <i>Saccharomyces boulardii</i>	82
Establecimiento del modelo no lineal para la producción semicontinua de levaduras del género <i>Saccharomyces boulardii</i>	91
Diseño de un controlador difuso que mejore la producción semicontinua de levaduras del género <i>Saccharomyces boulardii</i>	102
Caracterización de la contribución de la lógica difusa en la producción semicontinua de levaduras del género <i>Saccharomyces boulardii</i>	111
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	114
Conclusiones.....	114
Recomendaciones.....	117
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
APÉNDICE.....	138

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Representación esquemática: abordaje del problema.....	11
FIGURA 2. Biorreactores y sistemas auxiliares.....	26
FIGURA 3. Ciclo de Crecimiento de los microorganismos.....	36
FIGURA 4. Flujograma para la obtención del suero de leche y queso	39
FIGURA 5. Función de pertenencia de un conjunto difuso.....	49
FIGURA 6. Conjuntos difusos de tipo triangular y gaussiano.....	52
FIGURA 7. Componentes de un modelo difuso lingüístico.....	54
FIGURA 8. Esquema de un sistema con controlador difuso.....	59
FIGURA 9. Ejemplo de Controlador Difuso.....	60
FIGURA 10. Concentración de Biomasa de <i>Saccharomyces boulardii</i> ($\log_{10}$ Ufc/ml) con lactosuero enriquecido vs. Tiempo (h) para los tratamientos 2, 4, 8 y 12.....	86
FIGURA 11. Concentración de Biomasa de <i>Saccharomyces boulardii</i> ($\log_{10}$ Ufc/ml) con lactosuero enriquecido vs. Tiempo (h) para los tratamientos 3, 6, 7 y 9.....	88
FIGURA 12. Concentración de Biomasa de <i>Saccharomyces boulardii</i> ($\log_{10}$ Ufc/ml) con lactosuero enriquecido vs Tiempo (h) para los tratamientos 1, 5, 10, 11, 13 y 14.....	89
FIGURA 13. Contraste para la respuesta Y_1 : Cantidad de biomasa.....	93
FIGURA 14. Contraste para la respuesta Y_3 : Solidos totales	94
FIGURA 15. Contraste para la respuesta Y_4 : Potencial Oxido Reducción.....	95
FIGURA 16. Contraste para la respuesta Y_5 : Tiempo de latencia.....	96
FIGURA 17. Contraste para la respuesta Y_6 : Tiempo de máxima biomasa.....	96
FIGURA 18. Modelo para la respuesta Y_1 : Cantidad de biomasa.....	97
FIGURA 19. Modelo para la respuesta Y_3 : Sólidos totales.....	98
FIGURA 20. Modelo para la respuesta Y_4 : Potencial Oxido Reducción.....	98
FIGURA 21. Modelo para la respuesta Y_5 : Tiempo de latencia.....	99
FIGURA 22. Modelo para la respuesta Y_6 : Tiempo de máxima biomasa.....	99

FIGURA 23. Grafica de valores medidos vs Valores predichos, para la visualización de la bondad de ajuste de los modelos bajo diseño Hípercubo Latino.....	100
FIGURA 24. Optimización operativa bajo el diseño Hípercubo Latino.....	101
FIGURA 25. Estructura del Controlador Lógico Difuso CLD tipo Sugeno.....	104
FIGURA 26. Funciones de Pertenencia de la Variable Sustrato.....	105
FIGURA 27. Funciones de Pertenencia de la Variable tiempo.....	105
FIGURA 28. Variable de Salida (Flujo de Sustrato).....	106
FIGURA 29. Reglas Difusas del Controlador tipo Sugeno para Alimentación de Sustrato.....	106
FIGURA 30. Superficie de Acción de Control del Controlador tipo Sugeno para Alimentación de Sustrato.....	107
FIGURA 31. Diagrama del Sistema de Control Difuso del Biorreactor.....	107
FIGURA 32.a Concentración de Biomasa (g/l) vs. Tiempo (h).....	108
FIGURA 32.b Concentración de Etanol (g/l) vs. Tiempo (h).....	109
FIGURA 32.c Concentración de Sustrato (g/l) vs. Tiempo (h).....	109
FIGURA 32.d Concentración de Dioxido de Carbono (g/l) vs. Tiempo (h).....	110
FIGURA 32.e Concentración de Oxigeno (g/l) vs. Tiempo (h).....	110
FIGURA 32.f Volumen del Bioreactor (l) vs. Tiempo (h).....	111

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Contenidos en vitaminas del lactosuero.....	6
TABLA 2. Operacionalización de las variables.....	14
TABLA 3. Características taxonómicas de <i>Saccharomyces boulardii</i>	31
TABLA 4. Componentes del lactosuero dulce y ácido.....	40
TABLA 5. Contenido en vitaminas del lactosuero.....	41
TABLA 6. Características físicas y química del suero de leche.....	45
TABLA 7. Composición en aminoácidos esenciales (g/ 100g de proteínas).....	46
TABLA 8. Niveles o dosis naturales para los factores experimentales.....	66
TABLA 9. Matriz “D” de diseño de tratamientos codificada, hipercubo latino para 3 factores experimentales, para las respuestas biomasa, pH, SST y POR.....	67
TABLA 10. Publicaciones relevantes para el tema de estudio.....	80
TABLA 11. Caracterización física y química del lactosuero.....	83
TABLA 12. Matriz de diseño de tratamientos y respuestas tecnológicas medidas Biomasa, pH, SST, POR, Tiempo de laten y Tiempo de máx. ufc: Diseño hipercubo latino.....	85
TABLA 13. Valores de velocidad específica de crecimiento, Rendimiento en biomasa, Tiempo de generación y Productividad.....	90
TABLA 14. Parámetros Cinéticos del Proceso.....	91

PRÓLOGO

En Venezuela y el mundo a pesar de los avances en el conocimiento de la patogénesis de los procesos diarreicos, la diarrea aguda de tipo infeccioso constituye un problema de salud pública (Díaz y otros, 2014), representado una importante causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años, según la Organización Panamericana de la Salud (Organización Panamericana de la Salud, 2002). En América Latina, las enfermedades diarreicas son la principal causa de defunción de niñas y niños menores de un año (Velásquez, 1982; Marcano, 1994; Dupont y Capsuto, 1996; Bass, 2000; González y Cunil, 2002; Camaripano, 2007). Cabe precisar que durante los primeros seis años de vida los niños son muy vulnerables a diferentes tipos de enfermedades, siendo la diarrea es una de las más frecuentes de ellas (Velásquez, 1982), es por ello que los cultivos probióticos, como la *Saccharomyces boulardii* cobran gran importancia, debido a que actúan inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y mejoran los mecanismos de defensa del tracto gastrointestinal (Rodríguez y otros, 2008).

Por su parte, el impacto positivo causado por la lógica difusa, ha generado el desarrollo de una gran cantidad y variedad de trabajos de investigación a nivel mundial, con grandes alcances y diversas aplicaciones en el ámbito tecnológico y de ingeniería que van desde el control de complejos procesos industriales, hasta el diseño de dispositivos artificiales de deducción automática, pasando por la construcción de artefactos electrónicos de uso doméstico y de entretenimiento, así como también de sistemas de diagnóstico (Morales, 2002). De allí, que determinar la contribución de la lógica difusa para la producción semicontinua eficiente, eficaz y efectiva de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, resulte una investigación atractiva, sobre todo por la dificultad para caracterizar este proceso biotecnológico no lineal y por la posibilidad de revalorizar un subproducto propio de la manufactura del queso (lactosuero), reduciendo de esta forma su impacto al ambiente; debido a que en la transformación de 100.000 litros de leche / día en

quesos, se genera una contaminación equivalente a una población de 55.000 a 65.000 habitantes (Berruga, 1999; Riquelme, 2010).

Sobre la base de las consideraciones anteriores y motivado a que en la actualidad la población venezolana se encuentra atravesando por una grave crisis en materia de salud, donde la escasez y el desabastecimiento de medicamentos e insumos médicos se acrecienta con el pasar de los días, porque no se ha avanzado en fortalecer la producción interna llegando a importar el 84 % de los mismos (D'elia, 2014); y aunado a esto, las políticas han acentuado la dependencia de importaciones por la falta de divisas, esta investigación representa una alternativa que permitirá no solo el aprovechamiento eficiente de los recursos sino que también contribuirá al conocimiento universal fomentando el desarrollo de las áreas prioritarias para el bienestar de un país como lo son salud, ambiente y agroalimentaria.

Por lo anteriormente expuesto, a través de la presente investigación se pretende determinar la contribución de la lógica difusa producción semicontinua eficiente, eficaz y efectiva de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

El estudio teórico y experimental utilizado para la investigación está constituido por:

Capítulo I, El Problema. Este engloba todo lo concerniente al planteamiento del problema, formulación, objetivos generales y específicos, justificación, y los alcances y limitaciones de la investigación.

Capítulo II, Marco Teórico. Este capítulo proporciona las bases teóricas que darán conocimiento al problema. El mismo está dividido en: antecedentes, aspectos teóricos básicos y aspectos relacionados con el problema.

Capítulo III, Metodología. En este capítulo se aborda el tipo, el diseño, las técnicas y los procedimientos utilizados para llevar a cabo la investigación, de manera clara y sencilla, con la finalidad de que pueda ser referencia para futuras investigaciones.

Capítulo IV, Presentación y Discusión de Resultados. Este hace énfasis en los resultados y la interpretación de los datos obtenidos en la experimentación, asimismo muestra la mejora que se encuentra con el enfoque propuesto.

Capítulo V, Conclusiones y Recomendaciones. Este capítulo ofrece una respuesta, en forma clara y breve a las interrogantes planteadas en la investigación y que permitirá realizar sugerencias para futuras investigaciones.

Finalmente se presentan las referencias bibliográficas utilizadas, que representan un indicador directo del grado de profundidad de la investigación.

EL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el uso de las levaduras es importante para los estudios en el área de biotecnología y su aplicación en la industria, debido a que facilita el empleo de organismos vivos para la obtención de algún producto (bien o servicio) útil para el hombre (Díaz, 2003). Ésta se nutre de las fuentes de otras ciencias (Bet, 2010), antiguamente conocidas, y es posible describirla como una disciplina transversal (López y otros, 2010) que opera con base en los conocimientos de los seres vivos o sus partes, para obtener bienes y servicios en áreas como salud, industria, agricultura y medio ambiente.

Tradicionalmente el hombre ha empleado de forma empírica microorganismos (fundamentalmente, bacterias lácticas, levaduras y mohos) para la elaboración de una variedad de alimentos fermentados, entre los que se incluyen los derivados de la leche, los cereales, vegetales y pescados, pan y otros, desde la demostración a mediados del siglo XIX por Louis Pasteur de que los microorganismos son los responsables de la fermentación de los alimentos (Moran y otros, 2005; Alvarado, 2013). En este instante, las fermentaciones industriales se han convertido en procesos estrictamente controlados donde se emplean cultivos iniciadores especializados que hacen posible garantizar y estandarizar las características organolépticas del producto final. Pero el papel de los microorganismos, y/o de sus metabolitos, no se limita a la producción de alimentos fermentados en la industria, sino que también pueden emplearse con otros fines, como los cultivos probióticos (Visavet, 2007).

Los cultivos probióticos son microorganismos vivos que ingeridos en cantidades adecuadas, resultan beneficiosos para la salud o la fisiología humana, pues a medida que recorren el tracto gastrointestinal, generan efectos farmacodinámicos semejantes a los fisiológicos de la flora intestinal normalmente equilibrada (Buts, 2005).

Con el fin de producir *Saccharomyces boulardii* se requiere de ambientes apropiados, para esto es necesario que ciertas variables (como concentración de nutrientes, pH y temperatura) sean cuidadosamente mantenidas en valores específicos o rangos pre-establecidos. Para el cultivo de microorganismos son utilizados usualmente biorreactores, los cuales son recipientes o sistemas que mantienen un ambiente biológicamente activo (Hemson, 2006). Hay tres (3) modos básicos de realizar un proceso en un cultivo de microorganismos: por lote (*batch*), continuo (*continuous*) y semicontinuo (por lote alimentado o *fed-batch*) (Hidalgo y Lara, 2011).

Básicamente, el proceso semicontinuo se utiliza debido a sus posibilidades mejoradas de control (Crespo, 2010; Crespo, 2012; Cravo y Crespo, 2012), tomando como base un material que sirve de soporte al cultivo y que usualmente aporta nutrientes para el crecimiento de los microorganismos, como es el caso del lactosuero (Tabla 1), subproducto abundante de la industria láctea, obtenido de la manufactura del queso (Salazar, 1999), que anualmente refleja volúmenes de aproximadamente 110-115 millones de TM al año a nivel mundial. De este valor, el 45 % se desechan en ríos, alcantarillados y otros centros de recolección de aguas residuales. A manera de ejemplo, Colombia para el año 2006 produjo 6.024 millones de litros de leche destinando para su producción de queso 1.084 millones obteniendo una producción de lactosuero de 921.672 millones de litros (Parra, 2009; González, 2012). En México la producción de lactosuero es de unos 1.000 millones de litros estimándose que sólo se aprovecha un 53 %, eliminándose el resto como efluente altamente contaminante. Argentina, en el año 2008, destinó 4.200 millones de litros de leche para la industria quesera, cifra equivalente al 42 % de su producción generando 3.800 millones de litros de lactosuero utilizado para consumo animal, como materia prima para la industria y solamente se trata como efluente el 1 % de esta producción (Carrillo, 2006; Valencia y Ramírez, 2009; SUBAME, 2009).

Tabla 1. Contenidos en vitaminas del lactosuero

Vitaminas	Concentración (mg/ml)	Necesidades diarias (mg)
Tiamina	0,38	1,5
Riboflavina	1,2	1,5
Acido nicotínico	0,85	10-20
Piridoxina	0,42	1,5
Acido pantoténico	3,4	10
Cobalamina	0,03	2
Ácido ascórbico	2,2	10-75

Fuente: Linden y Lorient (1996).

En el caso de Venezuela la producción de leche para el año 2008 fue de 1.266,03 millones de litros, destinándose para la producción de queso el 63,1 %, obteniéndose unos 698,83 millones de litros de lactosuero al año. De éstos, un 25 % se utiliza en la producción de ricota, requesón y consumo animal, el resto se desecha (Faria y otros, 2003; CAVILAC, 2008), por lo que se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero (Berruga, 1999; Muñi y otros, 2005).

Por su parte, las levaduras presentan, en general, mayor resistencia a cambios ambientales bruscos, como son gradientes de pH, osmóticos, entre otros, que las bacterias lácticas, así como menores requerimientos nutricionales que redundan en la reducción de costos en los procesos de producción. Además, la mayor ácido-tolerancia de los hongos respecto de las bacterias resulta una ventaja importante, tanto en las fermentaciones, porque disminuye el riesgo de contaminación bacteriana, como en la calidad probiótica del

producto obtenido. Estos factores resultarán beneficiosos durante la etapa de producción, así como durante el almacenamiento y consumo (Leroy, 2001).

A nivel mundial la producción de biomasa a partir de levaduras se ha incrementado con diversos fines, entre ellos la fabricación de preparados probióticos, confeccionados a base de cultivos microbianos cuya función es estimular la flora gastrointestinal tanto en animales como en humanos. Para la producción de proteína unicelular (SCP, por su acrónimo en inglés) a partir de levaduras, se han estudiado cepas de *Saccharomyces cerevisiae* subespecie *boulardii*, demostrando que estas producen beneficios en el tracto gastrointestinal de los animales monogástricos, impidiendo la adherencia de bacterias patógenas en el tracto digestivo, inhibiendo las toxinas bacterianas y promoviendo condiciones favorables para el crecimiento y producción de bacterias ácido lácticas (Lee, 2000).

Con referencia a lo anterior, los cultivos de microorganismo han demostrado su amplia aplicabilidad tanto en el área farmacéutica como en la de alimentos, bebidas alcohólicas, productos químicos, combustible, entre otros., lo que le ha permitido a la industria de bioprocesos o procesos biotecnológicos crecer rápidamente. Sin embargo éstos no son sencillos de controlar debido a la dinámica de su modelo, que por lo general es altamente no lineal. Las estrategias de control convencional no proporcionan resultados satisfactorios al ser aplicadas en este tipo de procesos, y es por ello que se deben aplicar estrategias de control avanzado (Galicia y Lamed, 2013). La incorporación de conocimientos sobre lógica difusa puede proveer alternativas de control valiosas para procesos que no pueden describirse con un modelo matemático o que su desarrollo sea muy complejo, o para aquellos sistemas con características no lineales como es el caso de esta investigación.

En relación con este último, la lógica difusa es considerada una herramienta postmoderna y una de sus aplicaciones más importantes es el control de procesos

industriales (Hernández, 2008). En estos, los métodos convencionales de control automático resultan muy complejos y no siempre proporcionan resultados satisfactorios (Alarcón, 1995; Alcalá, 2007; Arteaga y Vásquez, 2012), debido a que requieren de modelos matemáticos de los procesos a los que se pretende aplicar; y en aquellos que son complejos o cuyo comportamiento es difícil de caracterizar debido a sus relaciones no lineales o a la incertidumbre inherente a éstos, resulta muy complicado obtener un modelo matemático representativo que permita la implementación del sistema de control (Claros, 2012).

Ante las dificultades de los procesos de control de producción de los macrobióticos, los controladores difusos representan una alternativa; pues proveen de algoritmos que posibilitan convertir una estrategia de control lingüístico, basada en el conocimiento de la experiencia, en una estrategia de control automático. Es decir, un control del proceso más cercano a la forma en que lo haría un operador experto utilizando su experiencia (Cotero, 2003). Su fundamento es la aplicación de la lógica difusa, la cual se define como una lógica multivaluada (Hellmann, 2001), que muestra valores intermedios en agregación a los convencionales como verdadero/falso, sí/no, alto/bajo, etc.; facilitando el manejo y proceso de cierto tipo de información inexacta, imprecisa o subjetiva, similar a como lo hace el cerebro humano (Puig, 2008).

En los últimos diez (10) años el control difuso ha emergido como una alternativa frente al control clásico, especialmente cuando se requiere para sistemas no lineales, que presentan dificultad al ser identificados. El diseño de un control difuso se realiza usualmente por un experto, quien plasma su conocimiento de la planta en la elección de parámetros como la distribución de funciones de pertenencia; los operadores usados para realizar la borrosificación, desborrosificación, reglas, agregación e implicación entre otros (Passino y Yurkovich, 1998).

El aspecto central de las técnicas de lógica difusa es que, a diferencia de la clásica, ésta tiene la capacidad de reproducir de manera aceptable y eficiente los modos usuales del razonamiento humano, al considerar que la certeza de una proposición es una cuestión de grado. Parte de la base del razonamiento aproximado y no del preciso como lo hace la lógica clásica. Las características más importantes de la lógica difusa son: la flexibilidad, la tolerancia con la imprecisión, la capacidad para modelar problemas no-lineales y su fundamento en el lenguaje del sentido común (Sosa, 2007; Reyes y otros, 2012), y en este sentido Crespo (2010) desarrolla un sistema de control basado en la lógica difusa para la obtención de un nivel de sustrato apropiado para el proceso semicontinuo de producción de levadura, lo que representa una forma estructurada de formulación del conocimiento, capaz de simular sistemas no lineales y al mismo tiempo incorporar información que no sea obtenida de datos del proceso.

Existen algunas metodologías para producción de *Saccharomyces boulardii* (Pardo y otros, 2009), donde se utiliza como medio de cultivo *agar Sabouraud* (4 % de glucosa) para el mantenimiento de las cepas y *agar Sabouraud* con 0,2 % de extracto de levadura (SABE) para el recuento de microorganismos viables, logrando demostrar que la metodología de las fermentaciones en lote resulta sencilla y adecuada para la obtención de biomasa de *Saccharomyces boulardii*, tanto en un medio semisintético, incluyendo glucosa como principal fuente de carbono y de energía, como en un medio conteniendo un sustrato de mucho menor costo (melaza de caña de azúcar).

En el contexto de la producción de microorganismos, la *eficiencia* se refiere a una relación entre los insumos disponibles y los productos generados en un periodo de tiempo determinado; la *eficacia* establece una relación entre las actividades planificadas para la producción de los microorganismos y los resultados logrados con su aplicación; la *efectividad* es la trascendencia de los objetivos planteados que deben ser alcanzados. Los objetivos son trascendentes en cuanto su aporte al conocimiento universal, al ambiente, a la soberanía agroalimentaria y a la salud. La medida de eficiencia se expresará por un cociente

entre los términos cuantitativos inherentes a los insumos utilizados y a los productos obtenidos en un periodo de tiempo determinado; la medida de eficacia se construirá en función de los grados de satisfacción de los grupos de interés sobre las levaduras del género *Saccharomyces boulardii*; y la medida de efectividad se definirá con la composición máximo-mínimo de la lógica estándar.

No obstante, la eficiencia del proceso de producción de microorganismos está sujeta al conocimiento de la cinética de crecimiento (Agudelo y otros, 2010), que se encarga de estudiar las velocidades de reacción que pueden presentar cambios en la carga microbiana que contiene, cuando son afectados por temperatura, humedad, pH, presión, la presencia y cantidad de reactantes y otras condiciones (Vásquez, 2007). Por las consideraciones anteriores, el conocimiento de la cinética de los microorganismos es muy importante, debido a que permite predecir la evolución de un cultivo, el consumo de sustrato y proporciona una idea clara de la acumulación del producto de una fermentación.

Tomando como base las reflexiones anteriores surgen las siguientes preguntas de investigación:

¿Cómo pudiera contribuir la lógica difusa en la producción de levadura del género *Saccharomyces boulardii*?

¿Cuáles son los parámetros cinéticos que caracterizan a la levadura *Saccharomyces boulardii*?

¿Por qué obtener un modelo no lineal de proceso de cultivo semicontinuo de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*?

Planteadas las preguntas de investigación se propone como proyecto determinar la contribución de la lógica difusa en la producción de levaduras del género *Saccharomyces* *boulardii* y la Figura 1 muestra un esquema de cómo se abordará el problema.

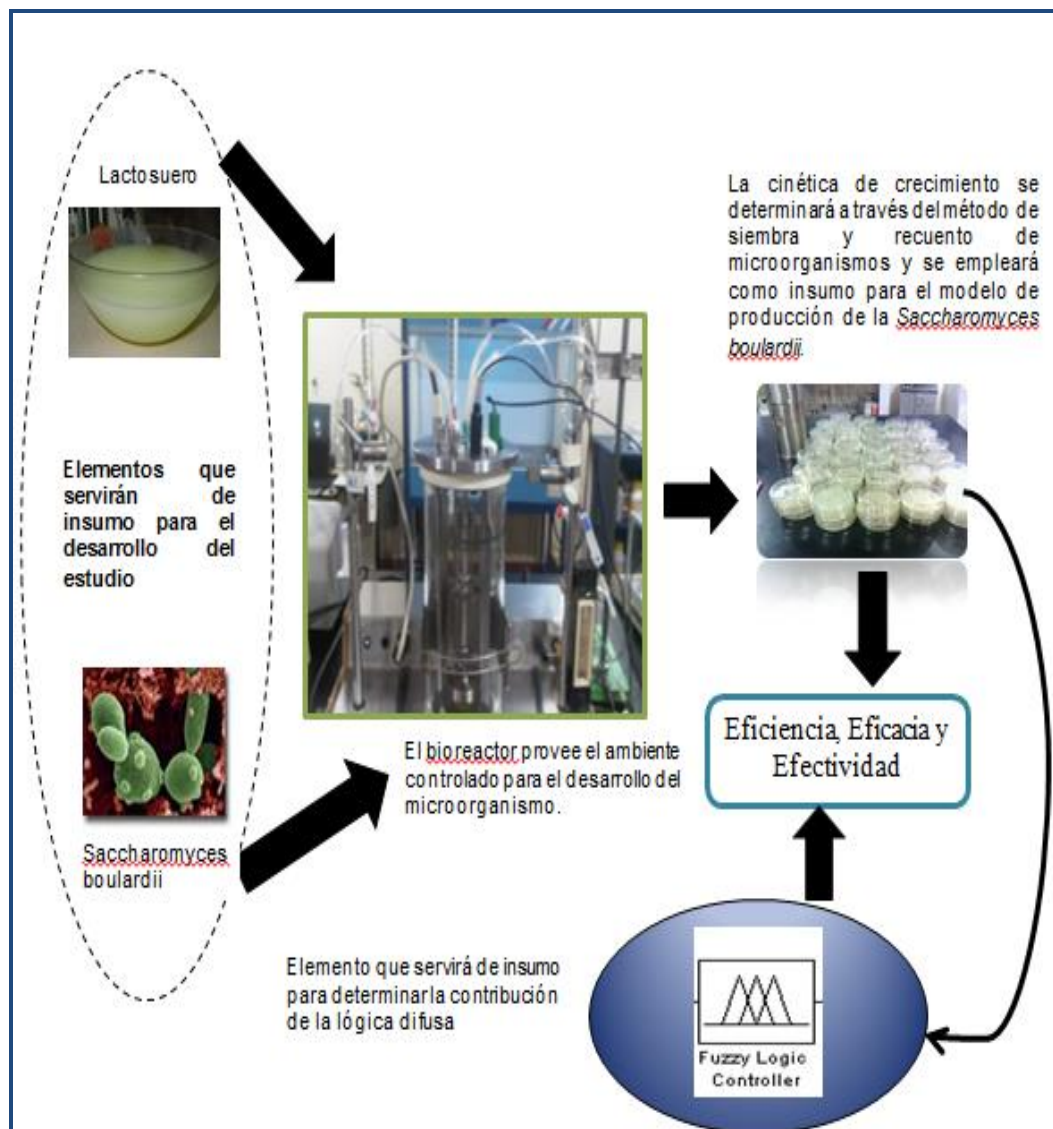


Figura 1. Representación Esquemática: Abordaje del Problema

Fuente: Autor (2020)

De la anterior representación inherente al empleo de la lógica difusa como una alternativa de control valiosa para describir la variabilidad del comportamiento de las levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, surge la necesidad de captar el fenómeno que presenta el proceso a través de un modelo que permita conectar los aspectos teóricos para entender la realidad y, en consecuencia, para modificarla (Hurtado, 2012).

Hecha la observación anterior, la lógica difusa presenta un gran campo de acción en este tipo de proceso, que puede llegar a ser difícil de modelar matemáticamente por la presencia de las relaciones no lineales en el crecimiento del microorganismo, debido a que ella emplea un diseño y sintonización del controlador difuso basado únicamente en la experiencia del experto en el proceso. Es decir, a través de la lógica difusa se incorpora el razonamiento humano en el algoritmo de control y simplifica el diseño de controlador (Guzmán y Castaño, 2006), permitiendo el modelaje de estos sistemas complejos de una forma más simple, ya que posee fundamentos matemáticos precisos pero no complicados, lo que se ha traducido en un aumento de sus aplicaciones en áreas como la medicina, economía y otras, donde la teoría de conjuntos posibilita imitar el comportamiento de la lógica humana a través de una descripción del proceso mediante reglas, o heurística, que son desarrolladas a partir de un conocimiento seguro del proceso (Strefezza, 2009).

Desde una perspectiva amplia, un controlador difuso proporciona un algoritmo que puede convertir una estrategia de control lingüística, generalmente basada en la experiencia de un operador humano, en una estrategia de control automático capaz de obtener una salida con una gran fiabilidad, de forma sistemática y sencilla, interpretando el conocimiento como una colección de restricciones difusas sobre una colección de variables (González, 1992).

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

GENERAL

Determinar la contribución de la lógica difusa como alternativa de control en la producción semicontinua eficiente, eficaz y efectiva de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la infraestructura tecnológica del sistema de producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*
2. Determinar los parámetros de experimentación para la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*
3. Establecer el modelo no lineal para la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.
4. Diseñar un controlador difuso que mejore la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.
5. Caracterizar la contribución de la lógica difusa en la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

En una investigación se observan y se miden variables. La medición permite explicar el comportamiento de las respuestas de las variables. La observación de las variables puede reflejar un comportamiento de variación de las mismas y la ciencia tiene como objetivo descubrir esas variaciones mediante repetidas observaciones determinando

el grado de variación que pudieran mostrar (Mendoza, 2015). Tomando como base lo anterior se hace necesario identificar las causas o factores que repercuten de manera directa e indirecta, en la producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. A estas causas o factores se les ha denominado variables del proceso.

Al respecto se debe clarificar lo que son definiciones conceptuales representadas por las teorías las cuales hacen referencia a los objetivos de la investigación (Tabla 2) y se encuentran estrechamente relacionadas con el cuerpo teórico y las operacionales descritas por las actividades que un observador debe registrar para poder medir la variable (Balestrini, 2006; Álvarez, 2008), por lo que integra el conjunto de sinergias e indicios que permiten caracterizar el evento, identificarlo y valorarlo (Hurtado, 2012).

Tabla 2. Operacionalización de las Variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	CONCEPTUAL	OPERACIONAL		
			Definición	Unidad	Técnicas e Instrumentos
Concentración de sustrato	Independiente	Cantidad del material de soporte del cultivo que se encuentra en el biorreactor en un momento dado	Cantidad expresada en peso por unidad de volumen del material de soporte del cultivo.	g/l	Observación directa y guía de observación, plan de calidad
Temperatura del cultivo	Independiente	Es una magnitud física que refleja la cantidad de calor, ya sea de un cuerpo, de un objeto o del ambiente	Es una escala relativa para la medida del calor o energía térmica de las partículas del cultivo que se desarrolla en el biorreactor	°C	Observación directa y guía de observación, termocupla

Fuente: Autor (2020)

Tabla 2 (continuación). Operacionalización de las Variables

Velocidad de Agitación	Independiente	Es la variación de la posición angular o recuento de impulsos en función del tiempo	Es una medida de la velocidad de rotación de un dispositivo agitador con aspas para el mezclado de partículas que están en el biorreactor	Rpm	Observación directa y guía de observación
Potencial Oxido Reducción	Dependiente	Es una forma de medir la energía química de oxidación-reducción mediante un electrodo, está relacionado con el pH y con el contenido de oxígeno. Es análogo al pH, debido a que este mide la actividad de protones y potencial redox mide el de los electrones.	Es la medida de la actividad de los electrones.	mV	Observación directa y guía de observación.
Concentración de Biomasa	Dependiente	Cantidad de microorganismos (levaduras género <i>saccharomyces boulardii</i>) que viven en un lugar determinado (biorreactor)	Cantidad de materia viva, expresada en peso o unidades formadoras de colonia (Ufc) por unidad de volumen	Ufc	Observación directa y guía de observación, contador de placas.
pH del cultivo	Dependiente	Concentración de iones hidrogeno [H3O+] presentes en determinadas sustancias	Es la medida de la concentración de iones de hidrógeno dentro del biorreactor	[°]	Observación directa y guía de observación, electrodos de pH.
Sólidos Totales	Dependiente	Es una magnitud física que refleja la cantidad de calor, ya sea de un cuerpo, de un objeto o del ambiente	Es una escala relativa para la medida del calor o energía térmica de las partículas del cultivo que se desarrolla en el biorreactor	° Brix	Observación directa y guía de observación.
Tiempo de latencia	Dependiente	Período determinado durante el que se realiza una acción o se desarrolla un acontecimiento.	Periodo medido en horas que tarda el microorganismo en adaptarse al medio antes de iniciar la fase de crecimiento exponencial.	H	Observación directa y guía de observación.
Tiempo de máxima biomasa	Dependiente	Período determinado durante el que se realiza una acción o se desarrolla un acontecimiento.	Periodo medido en horas en que el microorganismo alcanzó su máximo crecimiento.	H	Observación directa y guía de observación.

Fuente: Autor, (2020)

JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La presente investigación se encuentra enmarcada dentro de las estrategias y políticas gubernamentales del Proyecto Nacional Simón Bolívar 2013-2019, específicamente, en el lineamiento número 1, ítem 5, que contempla el desarrollo de las capacidades científico-tecnológicas vinculadas a las necesidades del pueblo, por lo que busca fortalecer y orientar la actividad científica, tecnológica y de innovación hacia el aprovechamiento efectivo de las potencialidades y capacidades nacionales para el desarrollo sustentable y la satisfacción de las necesidades sociales, orientando la investigación hacia áreas estratégicas definidas como prioritarias para la solución de los problemas sociales.

Por las consideraciones anteriores, la incorporación de conocimientos sobre lógica difusa en la producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, puede proveer alternativas de control valiosas para procesos que no pueden describirse con un modelo matemático o que su desarrollo sea muy complejo o para aquellos sistemas, con características no lineales como es el caso de esta investigación, donde las estructuras de control clásico son de alta complejidad al tratar de optimizar el producto final. De todo esto se desprende que la lógica difusa en la producción de levaduras de cultivos semicontinuos tiene la ventaja de permitir manejar simultáneamente información cualitativa y cuantitativa sin los problemas de agregación que presentan otros sistemas convencionales, debido a que el modelo semántico en que se basa, es proporcionado por la teoría de conjuntos difusos que ha demostrado en otras áreas del conocimiento, una mejor aproximación a la realidad, al admitir que la naturaleza tiene matices y que las decisiones se toman en función de una amplia gama de posibilidades y de criterios.

En ese mismo sentido, la investigación se afianza en las políticas y planes de salud que tienen como objetivo aumentar la producción de medicamentos, vacunas e insumos médicos del sistema público nacional de salud para la satisfacción de su demanda.

En relación a lo anterior y considerando la crisis por la que actualmente se encuentra atravesando Venezuela en esta materia, la investigación resulta de gran importancia debido a que *Saccharomyces boulardii* es un microorganismo probiótico u organismo vivo y viable, que puede ser exógeno al individuo y que es capaz de sobrevivir y colonizar el intestino del huésped transitoriamente, es resistente a la acción del ácido gástrico, la bilis y la destrucción cuando es procesado, interfiriendo con la acción de microorganismos patógenos gastrointestinales y estimulando la inmunidad general para aquellas personas que presentan enfermedades digestivas como: el síndrome del intestino irritable (SII), inflamación del intestino (EII, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa), la enfermedad de Lyme, colitis recurrente por *Clostridium difficile*, síndrome del intestino corto debido a un crecimiento excesivo de bacterias y la diarrea, en ésta se incluyen las infecciosas como son la diarrea por rotavirus en los niños, que representa una de las causas de muerte en niños menores de 5 años.

Adicionalmente, la investigación se encuentra incluida en el objetivo 5 del mismo Proyecto Nacional Simón Bolívar o Plan de la Patria que contempla la contribución en la preservación de la vida en el planeta y la salvación de la especie humana, más concretamente en el ítem 1 que se enfoca en construir e impulsar el modelo económico productivo eco-socialista, basado en una relación armónica entre el hombre y la naturaleza, que garantice el uso y aprovechamiento racional, óptimo y sostenible de los recursos naturales, respetando los procesos y ciclos de la naturaleza.

En este propósito, la investigación busca ofrecer un mejor aprovechamiento del residuo o desecho proveniente de la elaboración del queso (lactosuero) que contiene elementos de alto valor nutritivo (proteínas hidrosolubles, lactosa, vitaminas y sales minerales) susceptibles de ser utilizados en la síntesis de productos químicos y/o farmacéuticos o en la industria alimentaria (Fernández y otros, 2009) y que en las regiones llaneras es desechado al ambiente produciendo graves niveles de contaminación, que tienden al deterioro físico y químico de la estructura del suelo, lo que trae como

consecuencia una disminución en el rendimiento de los cultivos agrícolas y cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto.

De acuerdo con los razonamientos que se han venido realizando, esta investigación es importante debido a que genera aportes que se enfocan en áreas vitales para el desarrollo de un país, como lo son: ambiente, salud, soberanía agroalimentaria y conocimiento universal. En tal sentido, los aportes más relevantes se citan a continuación:

Aporte al Conocimiento Universal

- Hallazgo de una contribución de la lógica difusa en la producción eficiente, eficaz y efectiva de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, que permita mejorar la calidad de vida de los seres humanos, con el menor costo posible, con gran exactitud, en el menor tiempo sin desperdiciar recursos materiales.

Aporte al Ambiente

- Proporciona una nueva ruta para el mejor aprovechamiento del lactosuero, a fin de evitar ser desechado como efluente y de esta forma reducir su impacto al suelo, a la flora y fauna acuática.

Aporte a la Soberanía Agroalimentaria

- El lactosuero como sustrato para el cultivo de *Saccharomyces boulardii* permite el mejor aprovechamiento de sus proteínas, vitaminas y azúcares, las cuales poseen propiedades funcionales útiles en el área de los alimentos, generando así un valor agregado a este subproducto proveniente de la elaboración del queso.

Aporte a la Salud

- Mejora la salud pública como consecuencia de las implicaciones beneficiosas de los probióticos (*Saccharomyces boulardii*) en enfermedades prevalentes, como: la diarrea asociada con rotavirus en lactantes y niños, diarrea aguda por el uso de antibióticos en adultos, garantizando una flora intestinal estable y bien equilibrada que evite la colonización y el sobredesarrollo de microorganismos patógenos.

ALCANCES

En esta investigación se determinará la contribución de la lógica difusa en la mejora de un proceso biotecnológico de cultivo para la producción a escala de laboratorio de cepas del género *Saccharomyces boulardii*. El tipo de equipo que se utilizará para llevar a cabo el proceso es un biorreactor para producir en forma semicontinua (“fed-batch”). El biorreactor semicontinuo se seleccionó debido a que el mismo permite controlar la velocidad de crecimiento, regulando la velocidad de alimentación (caudal), satisfaciendo además, la necesidad de alimentar el cultivo con medio fresco.

Se centrará la atención en el crecimiento de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, porque requieren sólo soluciones simples de nutrientes, pueden crecer a grandes velocidades y son de gran utilidad, debido a que pertenecen al grupo de los microorganismos probióticos con propiedades bioterapéuticas comprobadas, que benefician la salud humana cuando se ingieren en concentraciones adecuadas. Las mismas actúan como una flora temporal que protege el sistema intestinal y lo mantiene en buen funcionamiento, colaborando con el organismo para restablecer la microflora. En los intestinos, produce ácido láctico y vitaminas B, y elimina las cepas de levaduras hostiles (Ortiz y otros, 2008).

Asimismo, el empleo del suero de leche (lactosuero) como medio para el crecimiento de la *Saccharomyces boulardii*, radica en el aprovechamiento de un subproducto de la industria láctea, que puede adquirirse con facilidad, de bajo costo y además contiene nutrientes importantes para el desarrollo de la levadura.

La validación de los resultados del trabajo propuesto se realizó a través de la simulación del control de lazo cerrado del proceso seleccionado, utilizando herramientas computacionales que permitieron garantizar las premisas de máxima producción de biomasa de levadura del género *Saccharomyces boulardii*, con su obtención en el menor tiempo posible y una fase de latencia del microorganismo mínima, evidenciándose por ende su impacto en la productividad.

“Conocer lo que se ha hecho con respecto a un tema ayuda a no investigar sobre algún tema que no se ha estudiado a fondo” Hernández et al., 2010

MARCO TEÓRICO

En este capítulo se presenta un cuerpo de ideas básicas que proporcionan un sistema coordinado y coherente de conceptos y proposiciones que ayudan a explicar la evolución de la investigación (Elgueta y otros, 2002), relativa a la contribución de la lógica difusa en la producción semicontinua eficiente, eficaz y efectiva de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

ANTECEDENTES

Los antecedentes constituyen "una síntesis conceptual de las investigaciones o trabajos realizados sobre el problema formulado" (Tamayo, 2004, p.61). Según el mencionado autor los antecedentes conforman todo hecho anterior a la formulación del problema que sirve para aclarar, juzgar e interpretar el problema planteado. Asimismo, para otros autores, “debe incluirse un pequeño recuento histórico del problema que lo explique y lo ubique en el momento presente” (Hurtado y Toro, 2007, p.32). Tomando como base lo planteado anteriormente, algunos trabajos recientes de investigación relacionados con el tema de estudio se citan a continuación:

- Rojas y otros, (2017), Venezuela. Efecto de los sustratos mango (*Mangífera indica*), inulina (*Inula helenium*) y lechada de maíz (*Zea mays var. saccharata*) en la producción eficiente de *Saccharomyces boulardii*, esta investigación centró su atención en determinar el efecto de los sustratos no convencionales como el mango, que representa uno de los frutos más abundantes del estado Cojedes y se caracteriza por presentar altos contenidos de vitaminas, minerales y azúcares. Por su parte la inulina es conocida por su acción en la estimulación del crecimiento de bifidobacterias en el intestino y la lechada representa un subproducto proveniente de la molienda del maíz para cachapa que es poco aprovechado a nivel nacional y que presenta altos contenidos de proteínas, vitamina A, B y C, caroteno (liposolubles), minerales en

concentraciones muy bajas (78 %), importantes para el desarrollo de los microorganismos. Para ello se simuló el comportamiento del sistema a lazo cerrado y posteriormente se evaluó la eficiencia de los sustratos empleando análisis envolvente de datos (DEA). Al comparar los resultados obtenidos con la simulación utilizando DEA, se pudo concluir que el sustrato más eficiente para el desarrollo del microorganismo es la lechada de maíz, debido a que la misma produjo más unidades formadoras de colonia para el período de tiempo muestreado, reflejando una eficiencia relativa de 1000 %.

- Arteaga y Vásquez (2012), Perú. En esta investigación se logró implementar un sistema de control automático por lógica difusa de oxígeno disuelto (OD), pH y temperatura en un biorreactor columna de burbujas (BCB), para la producción de biomasa de *Candida utilis* CECT 10704. Su desempeño se comparó con el control proporcional clásico. Para el control se diseñó, construyó y programó una tarjeta de adquisición de datos, utilizando el software Eagle 4.14 para el diseño, y Microcode Studio Plus 3.0 para la programación. Se elaboró un programa en Visual Basic 6.0, que enlazó con MatLab 7.0 para el control difuso; utilizando la inferencia Mamdani, funciones de membresía de entrada y salida trapezoidal y triangular; 4 reglas para el OD, 3 para el pH y 3 para la temperatura; con conector tipo *and* y para desdifusificar el método del centroide. La evaluación de la producción de biomasa se realizó mediante la determinación de peso seco y cinética de crecimiento con el modelo de Gompertz. El control difuso del OD, pH y temperatura, mostró superioridad al control proporcional; caracterizado por un control muy cercano al set point y una menor desviación estándar.
- Crespo (2012), Venezuela. Medición de eficiencia en un cultivo de levaduras utilizando análisis envolvente de datos. Esta investigación permite analizar, a través del método DEA (Análisis Envolvente de Datos), la eficiencia en la producción de biomasa (ufc) a partir de un consumo de nutrientes, esto debido a que, en este

proceso biotecnológico es deseable el aumento en la población de microorganismos (biomasa) o la formación de un producto secundario hecho por los microorganismos, por lo que es necesario unas condiciones ambientales optimas, así como un buen aprovechamiento de los insumos para que la producción de levadura (biomasa) sea eficiente. En este propósito, el análisis envolvente de datos a través del software análisis Frontier Baxia demostró que con una concentración de 15 % de lactosuero enriquecido, se obtiene una eficiencia relativa (eficiencia productiva) superior al 100 %, con la que es posible maximizar la biomasa de *Saccharomyces boulardii* hasta obtener $7,78 \times 10^8$ Ufc/ml.

- Cravo y Crespo (2012), Venezuela. Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* en un cultivo Semicontinuo. A través de esta investigación se comprobó que el crecimiento del *Lactobacillus casei* en presencia del sustrato lactosuero produce una mejor respuesta ($1,18 \times 10^9$ Ufc/ml en 9 horas) que el sustrato agua de avena (1×10^3 Ufc/ml en 7 horas). Para la validación se utilizó el Simulink de MATLAB, a fin de simular el comportamiento del modelo de crecimiento para el proceso de cultivo.
- González (2012), Venezuela. Aspectos medio ambientales asociados a los procesos de la industria láctea. En esta investigación se realiza una revisión de los usos potenciales del lactosuero resaltando la importancia de aprovecharlo para el mejoramiento del bienestar animal y como materia prima en procesos de elevada selectividad que eliminen agua, recuperen lactosa, proteínas, sales minerales, generando valor agregado y así evitar desecharlo como efluente por su elevado costo económico y ambiental. Se propone la implementación de políticas de control de la contaminación basadas en la prevención eliminando la misma en su punto de origen al aplicar en forma continua estrategias integradas a procesos, productos y servicios utilizando las mejores técnicas disponibles, principios de la producción más limpia.

- Crespo (2010), Venezuela. Sistema de control difuso para la alimentación de sustrato en un cultivo semicontinuo de levaduras. En esta investigación se desarrolló el diseño de un sistema basado en lógica difusa para controlar la alimentación de sustrato (glucosa) en un proceso biotecnológico de cultivo para producción a escala de laboratorio de cepas de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Se creó un software del proceso y se comprobó que reprodujera el comportamiento del proceso mediante el diseño de dos tipos de controladores difusos, uno de tipo Sugeno de orden cero y otro de tipo Mamdani, comprobando que las respuestas obtenidas con ambos producen mejores resultados que los presentados por otros autores.
- Pardo y otros, (2009), Argentina. Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del preacondicionamiento fisiológico. El objetivo de esta investigación fue evaluar la vitalidad y la viabilidad de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* después de su congelación y descongelación, y el efecto del preacondicionamiento fisiológico sobre dichas propiedades. Los resultados indican que la velocidad específica de crecimiento ($0,3 \text{ h}^{-1}$) y la biomasa ($2\text{-}3 \times 10^8$ células/ml) de *Saccharomyces boulardii* obtenida en frascos agitados tanto a 28 como a 37 °C fueron semejantes. El cultivo de esta levadura en biorreactores en lote, utilizando glucosa o melaza de caña de azúcar como fuente de carbono, alcanzó rendimientos de 0,28 g de biomasa/g azúcar consumida en 10 h de cultivo a 28 °C, obteniéndose resultados similares en fermentaciones en lote alimentado. Se concluye que condiciones de estrés como las estudiadas en este trabajo disminuyen la vitalidad de *Saccharomyces boulardii*. Además, la cepa estudiada presentó buena tolerancia a las sales biliares aún a bajos valores de pH del cultivo.

BASES TEÓRICAS

En esta sección se presentan conceptos, datos, información sobre la problemática abordada, los factores que la constituyen, las variables en estudio, y puntos que permitirán establecer la contribución de la lógica difusa en la producción semicontinua eficiente, eficaz y efectiva de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

BIORREACTORES

Un biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo (Hemson, 2006). En algunos casos (fermentación alcohólica, láctica, acética, entre otras.), un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Estos biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros hasta metros cúbicos y son usualmente fabricados de acero inoxidable.

Un biorreactor puede utilizarse para hacer crecer células o tejidos en operaciones de cultivo celular. En términos generales, busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, concentración de nutrientes, entre otras) al elemento que se cultiva (Menzella, 2017).

Los biorreactores se pueden clasificar de acuerdo al modo de operación: discontinuo, semicontinuo, continuo. Esta clasificación se aplica a cualquier reactor, sea químico o biológico (biorreactor). Al manipular un biorreactor en un determinado modo de operación (discontinua, semicontinua, continua), automáticamente queda determinado el tipo de cultivo del sistema y se definen los parámetros y las características operativas y de diseño que intervienen en el proceso productivo.

El biorreactor está compuesto de una serie de dispositivos, instalaciones auxiliares, sistemas de aireación o gases, sistemas de conducción de vapor y filtros de aire que facilitan el control del proceso. Para su operación se requiere de ductos y acceso para inocular asépticamente, tomar muestras, medir y controlar temperatura, pH, oxígeno, espuma, gases y productos. Además debe poseer un sistema de retroalimentación de datos, que permita realizar un control automatizado. La Figura 2 muestra un biorreactor con sus sistemas auxiliares. Se incluye además un agitador con aspas para mezclado.



Figura 2. Biorreactor y sistemas auxiliares

Fuente: Crespo, (2012).

CLASIFICACIÓN DE LOS BIORREACTORES

- **CLASIFICACIÓN OPERATIVA:** tanto biorreactores como fermentadores se clasifican primeramente de acuerdo al modo de operación: discontinuo, semicontinuo, continuo. En los reactores biológicos el modo de operación define el sistema de cultivo que es el mismo y delimita la clasificación procesal-productiva del bioproceso (cultivo).

- **CLASIFICACIÓN BIOLÓGICA:** los sistemas biológicos deben interaccionar con el ambiente externo para poder crecer y desarrollarse; es por eso que los biorreactores se clasifican biológicamente de acuerdo al metabolismo procesal del sistema de cultivo: anaeróbico, facultativo, aeróbico. Los bioprocesos de cultivo y las fermentaciones están basados en el metabolismo celular del cultivo. El metabolismo define los parámetros y características operativas-biológicas de diseño y de operación del biorreactor. Estas características son las que intervienen en la parte biológica del sistema y tienen que ver con el crecimiento, productividad y rendimiento del cultivo; por lo que, definen la clasificación biológica-procesal del sistema de cultivo.
- **CLASIFICACIÓN BIOLÓGICA-OPERATIVA:** ambas clasificaciones; la biológica y la operativa, son procesalmente interdependientes y en su conjunto afectan el diseño final del biorreactor. Al combinarse ambas clasificaciones, se obtiene una función operativa y la biológica para establecer entre ambas un propósito de utilización, el modo de cultivo y el bioproceso. Siendo el propósito de utilización, el destino de cultivo del biorreactor; para qué tipo de cultivo va a ser utilizado el biorreactor; el modo de cultivo es sinónimo de sistema de cultivo y el bioproceso es en sí, todo el proceso (Rivera y Suarez, 2010).

BIORREACTORES Y TIPOS DE CULTIVO

Los sistemas biológicos que determinan el metabolismo celular de cultivo y el modo procesal-biológico del sistema son:

- **CÉLULAS Y MICROORGANISMOS ANAERÓBICOS:** bacterias en su gran mayoría, son microorganismos de metabolismo degradativo (catabólico); generalmente unicelulares, estos microorganismos son autónomos y

nutricionalmente independientes (autótrofos); sus células (cuerpos) no respiran (no utilizan la glucólisis para la respiración celular), en cambio, utilizan vías alternas, donde una molécula orgánica, producida durante el proceso metabólico (catabolismo), es utilizada como aceptor de electrones, en un proceso bioquímico conocido como respiración oxidativa; esta molécula es reducida a producto orgánico en un proceso comúnmente denominado fermentación.

- **CÉLULAS Y MICROORGANISMOS FACULTATIVOS:** son ambivalentes, tienen la capacidad de vivir o sobrevivir entre ambientes: aeróbico (presencia de oxígeno) y anaeróbico (ausencia de oxígeno); son microorganismos de metabolismo mixto por lo que, pueden tanto degradar (catabolismo) como construir (anabolismo) materia orgánica, a partir de diferentes sustratos (materia prima), tanto orgánicos como inorgánicos. Pese a su versatilidad, sus mayores representantes son microorganismos que presentan relaciones parásitas o simbióticas tales como: hongos y levaduras, por lo que no son muy extensos.
- **CÉLULAS Y MICROORGANISMOS AERÓBICOS:** pertenecen en su mayoría al Reino Eucariota – pero también los hay procariota – son microorganismos y células que respiran (utilizan la glucólisis como forma de respiración celular); por lo que su metabolismo es constructivo (anabólico) y deben obtener sus nutrientes de diferentes fuentes. Sus principales grupos están representados por: bacterias y microorganismos aeróbicos, plantas y animales; cuyas células se puedan cultivar en suspensiones celulares o bien, en diferentes arreglos artificiales o modificadas.

A continuación, se presentan algunos de los posibles sistemas de cultivo que se pueden realizar y el tipo de biorreactor asociado a cada uno (Rivera y Suarez, 2010; ESIA, 2015):

- **CULTIVOS MICROBIANOS ANAERÓBICOS - FERMENTADOR BACTERIAL (CO₂):** los microorganismos de metabolismo anaeróbico son los más

simples de todos, tan solo necesitan de un medio de cultivo adecuado, agitación vigorosa y cierta cantidad de CO_2 (dióxido de carbono) disuelto (COD) para crecer y multiplicarse.

- **CULTIVOS MICROBIANOS FACULTATIVOS – FERMENTADOR BACTERIAL:** los microorganismos facultativos toleran la presencia oxígeno en bajas concentraciones y además de un sustrato adecuado, sólo requieren agitación moderada y un medio de cultivo para crecer y desarrollarse.
- **CULTIVOS CELULARES AERÓBICOS Y FACULTATIVOS – FERMENTADOR MICÓTICO (CO_2):** los cultivos celulares se diferencian de los bacteriales (microbios) en que no son microorganismos procariota, son eucariota. Son microorganismos aeróbicos o facultativos pertenecientes al Reino Fungi (hongos y levaduras), generalmente llamados micóticos, requieren de la presencia de CO_2 disuelto en el medio como sustrato limitante de la velocidad de reacción y generan estructuras reproductivas muy particulares.
- **CULTIVOS CELULARES AERÓBICOS ESTRICTOS – FERMENTADOR CON AIREACIÓN (O_2):** el cultivo de microorganismos celulares (no bacteriales) aeróbicos estrictos requiere la presencia de oxígeno disuelto en el medio de cultivo para el metabolismo celular; así como una adecuada agitación.
- **CÉLULAS VEGETALES EN SUSPENSIÓN – BIORREACTOR DE LEVANTAMIENTO POR AIRE (O_2) EN RÉGIMEN TURBULENTO ($Re \geq 3000$):** las células vegetales pueden ser cultivadas en: pequeños agregados celulares que se suspenden en el medio de cultivo mediante agitación. Dado que las células vegetales respiran, el diseño del biorreactor debe incorporar una línea de aireación para suministrar oxígeno disuelto (OD) al medio de cultivo. El diseño

debe contar con agitación vigorosa, pues los agregados celulares vegetales tienden a agruparse (clusters) y de alcanzar gran tamaño y peso, precipitarían. Por eso, la operación de este tipo de biorreactores debe ser en régimen turbulento ($R \geq 3000$). Los biorreactores para células vegetales en suspensión generalmente son diseñados con un mecanismo de levantamiento por aire “air lift” que combina una agitación vigorosa (turbulenta) con una adecuada aireación (oxígeno disuelto) del medio de cultivo.

LEVADURAS

Los seres humanos han usado microorganismos desde tiempos muy antiguos, probablemente desde la prehistoria y tal vez por accidente; después se empezaron a usar empíricamente en la producción de bebidas, comidas, textiles y antibióticos.

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de células, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. De hecho, constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de actuar como reconstituyente de la flora intestinal como es el caso de *boulardii*.

La *Saccharomyces boulardii* es una levadura natural no modificada genéticamente que es aislada de la corteza del árbol del litchi en Indochina. Esta levadura muestra un crecimiento óptimo a una temperatura inusualmente alta de aproximadamente 37 °C y, por ello, se le considera como una "levadura de temperatura extremadamente alta".

Aunque la *Saccharomyces boulardii* es similar a *Saccharomyces cerevisiae*, existen algunas diferencias relativas a sus características taxonómicas (Tabla 3), metabólicas y genéticas (Maillié y otros, 2001).

En la forma liofilizada, *Saccharomyces boulardii* es la sustancia activa de un producto medicinal comercializado en casi 100 países de todo el mundo, con diferentes nombres de marca, presentaciones y concentraciones de dosis; generalmente se presentan en cápsulas de 50 mg.

Tabla 3. Características taxonómicas de *Saccharomyces boulardii*

CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS	
Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Subfilo:	Saccharomycotina
Clase:	Saccharomycetes
Orden:	Saccharomycetales
Familia:	Saccharomycetaceae
Género:	<i>Saccharomyces</i>
Especie:	<i>S. boulardii</i>

Fuente: Bujalance, (2006)

La *Saccharomyces boulardii* liofilizada es un ejemplo de lo que se conoce como "medicamento probiótico":

- "Probiótico" porque *Saccharomyces boulardii* liofilizada se reactiva en el tracto gastrointestinal después de su administración oral y tiene un "impacto positivo en la salud y fisiología del huésped" (Marteau y otros, 2001). Algunas veces el término "agente bioterapéutico" es preferible frente al término "probiótico" para designar a aquellos microorganismos probióticos que "previenen o tratan enfermedades humanas" (Buts, 2005; Elmer y otros, 1996).

- "Medicamento" porque la fórmula liofilizada se prepara, empaqueta y pone a prueba tal como se hace con un medicamento y porque el expediente farmacéutico y clínico de *Saccharomyces boulardii* liofilizada ha sido elaborado de conformidad con las regulaciones de comercialización de productos medicinales de los países donde el producto está a disposición del público.

Por lo tanto, *Saccharomyces boulardii* liofilizada es un medicamento probiótico que se diferencia claramente de los alimentos probióticos que contienen varias cepas de microorganismos que se administran a animales para mejorar la producción zootécnica o a seres humanos sanos (generalmente en la forma de yogures o productos lácteos) para fortalecer la fisiología del huésped, cuando no existe enfermedad alguna.

FORMA Y FARMACOCINÉTICA

La *Saccharomyces boulardii* liofilizada se obtiene a través del secado por congelación en presencia de lactosa. Este método permite que la levadura se mantenga viva y estable. Un estudio de las propiedades farmacodinámicas de *Saccharomyces boulardii* demostró que, en la mayoría de casos, dichas propiedades están asociadas a su capacidad de reactivación. Al igual que todas las levaduras, *Saccharomyces boulardii* es genéticamente resistente a los antibióticos antimicrobianos; para casi todos los antibióticos estudiados, el valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de *Saccharomyces boulardii* siempre es muy alto > 128 mg/l (Bergogne, 1995).

Saccharomyces boulardii es resistente a la acidez gástrica y a la proteinólisis y puede almacenarse rápidamente en grandes cantidades en el tracto gastrointestinal, manteniendo niveles constantes en forma viable (Mcfarland y Bernasconi, 1993).

En los animales agénicos (estériles), la levadura *Saccharomyces boulardii*, administrada en una sola dosis, se aloja y permanece en el tracto gastrointestinal, pero en concentraciones menores (5×10^7 células/g heces) a las que se albergan en los microorganismos naturales de la flora intestinal dominante ($10^9 - 10^{10}$), lo que demuestra la

capacidad de esta levadura para adaptarse a las condiciones fisicoquímicas del medio intestinal. Por su parte en los animales hologénicos (con flora bacteriana normal), la levadura *Saccharomyces boulardii* se elimina rápidamente en unos cuantos días. Esto significa que cuando la flora es normal, *Saccharomyces boulardii* no se instala en el tracto gastrointestinal (Ducluzeau y Bensaada, 1982).

Un análisis de la cinética de eliminación de las heces de células vivas de *Saccharomyces boulardii* durante la administración regular de este producto en forma liofilizada ($\pm 4 \times 10^{10}$ células viables de *Saccharomyces boulardii*) en voluntarios adultos saludables, reveló que al tercer día de administración se alcanzó una condición estable de aproximadamente 108 células/día. *Saccharomyces boulardii* desaparece de los excrementos dos o cinco días después de interrumpir la terapia. La tasa de recuperación de células vivas a partir de las heces se estimó en 0,2 % - 0,4 % en ratas (Boddy y otros, 1991) y en los seres humanos (Klein y otros, 1993), con una relación lineal dosis/recuperación. Este coeficiente se multiplica cuando los sujetos reciben simultáneamente un antibiótico activo contra la flora anaeróbica dominante del colon (ampicilina) (Klein y otros, 1993). Un estudio clínico realizado en pacientes que han sufrido infecciones recurrentes causadas por *Clostridium difficile* y que han sido tratados con una dosis diaria de 1 g de *Saccharomyces boulardii* reveló que la concentración de células viables de levadura en las heces de los pacientes que no presentaron recaídas posteriores fue, en promedio, más alta (1×10^6 células/g) que la observada en pacientes que sufrieron una recaída ($2,5 \times 10^4$ /g, $P = 0,02$). Por lo tanto, existe una relación causal importante entre el nivel de concentración de *Saccharomyces boulardii* en las heces y la actividad terapéutica del fármaco (Buts, 2005; Elmer y otros., 1999).

MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Saccharomyces boulardii*

- Acción luminal: mejora la integridad de la unión estrecha entre los enterocitos y las cadenas (AGCC), que están alterados cuando existe una enfermedad subyacente.

- Acción anti-toxina: interfiere con las toxinas patógenas dificultando su unión a la luz intestinal mediante el bloqueo de los receptores de las toxinas patógenas, o actuando como un receptor señuelo para la toxina y la destrucción directa.
- Actividad antimicrobiana: *Saccharomyces boulardii* inhibe directamente el crecimiento de patógenos, tales como *Candida albicans*, *Salmonella Typhimurum*, *Yersinia enterocolitium*, *Aeromonas*, etc.
- “Cross-talk” con la microbiota normal: labor conjunta, además de la digestión, en la "resistencia a la colonización". Produce bacteriocinas (enzimas perjudiciales para el crecimiento de patógenos). Actúa como sustituto de la microflora normal hasta que se logra su restablecimiento cuando ha sido alterada.
- Efectos tróficos: *Saccharomyces boulardii* reduce la mucositis, restaura las vías de transporte de fluidos, y tiene un efecto trófico por la liberación de espermina y espermidina, que ayudan a la maduración de los enterocitos (Dalmasso y otros, 2006).
- Regulación de la respuesta inmune y acción antiinflamatoria: *Saccharomyces boulardii* actúa como inmunomodulador, tanto dentro de la luz intestinal como a nivel sistémico. Aumenta los niveles de IgA secretora en el intestino y reduce las respuestas pro-inflamatorias, al afectar la migración de las células T, promoviendo su acúmulo en los ganglios linfáticos mesentéricos y limitando tanto la infiltración de las células Th1 en el colon como la amplificación de la inflamación inducida por la producción de citocinas proinflamatorias (Thomas y otros, 2009); función similar al efecto protector de la flora normal del colon. Además, *Saccharomyces boulardii* tiene un efecto antiinflamatorio adicional inhibiendo la activación de las células dendríticas inducida por los LPS (Thomas y otros, 2011, Pothoulakis, 2009)

- Los recientes avances en la comprensión de la inmunología de la mucosa GI y la evidencia de los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de *Saccharomyces boulardii* abren perspectivas prometedoras (Zanello y otros, 2009; Im y Pothoulakis, 2010). Estos resultados sugieren que la administración de *Saccharomyces boulardii* puede tener un efecto beneficioso en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un aumento de la permeabilidad intestinal, la inflamación y la translocación bacteriana (Swidsinski y otros, 2010; Tincati y otros, 2009). También puede ser capaz de reducir la translocación bacteriana y la consiguiente inflamación crónica que caracteriza la infección por el VIH (Villar, 2017)

CICLO DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS MICROBIANOS

En un cultivo microbiano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano (Campbell y Reece, 2007):

- **FASE LAG O DE ADAPTACIÓN:** durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial.
- **FASE EXPONENCIAL O LOGARÍTMICA:** en ella la velocidad de crecimiento es máxima. Durante esta fase los microbios consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima.
- **FASE ESTACIONARIA:** en ella no se incrementa el número de microbios. Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios. Los microorganismos entran en fase estacionaria bien porque se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea

inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento.

- **FASE DE MUERTE:** se produce una reducción del número de microbios viables del cultivo.

Las fases, parámetros y cinética de crecimiento discutidas para el caso de los medios líquidos se presentan también en los sólidos (Figura 3).

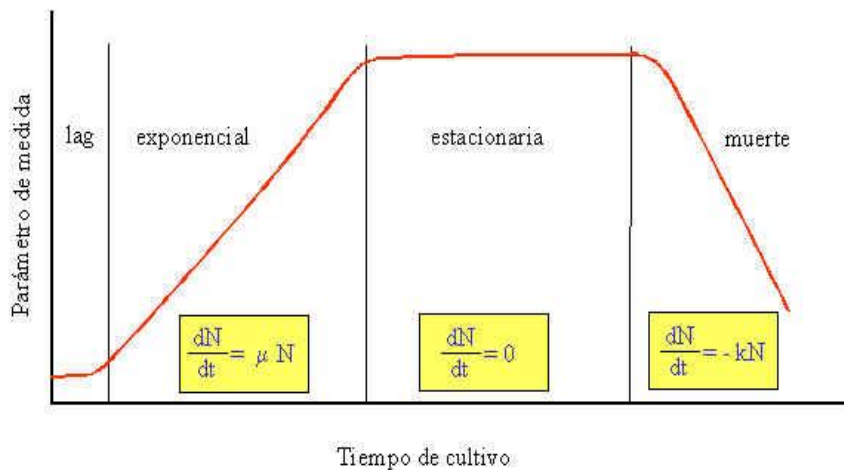


Figura 3. Ciclo de Crecimiento de los Microorganismos

Fuente: Campbell y Reece, (2007).

CONTROL DE CULTIVOS SEMICONTINUOS EN BIORREACTORES

Durante el cultivo semicontinuo, uno o más nutrientes son suplidos al biorreactor hasta el final de la operación. Dado que la sobrealimentación o la subalimentación de nutrientes perjudica el crecimiento de las células y la formación de productos; el desarrollo de una estrategia de alimentación es crítica en los cultivos semicontinuos. Se han desarrollado varias estrategias para controlar la concentración de nutrientes dentro de un rango óptimo y han sido aplicados al cultivo de varios tipos de microorganismos.

El desarrollo de sistemas de control en estos casos no es directo debido a la falta de modelos exactos que describan el crecimiento de las células y la formación de productos, la

naturaleza no lineal del bioproceso, la respuesta lenta del proceso, y la deficiencia de sensores en línea para la cuantificación de las variables clave.

Se han desarrollado diversas estrategias para el control de alimentación de cultivos semicontinuos (Victores y otros, 2008; Crespo, 2012), entre ellos:

- **Suministro de flujo de sustrato con control de lazo abierto, con un perfil predeterminado exponencial en el tiempo.** Esta estrategia de alimentación no usa variables medidas para manipular la velocidad de alimentación; en su lugar el controlador manipula la velocidad de alimentación sólo mediante la referencia a ecuaciones de un modelo matemático exponencial dependiente de un parámetro que representa la velocidad específica de crecimiento. Dado que este método asume que las células crecen exponencialmente con el tiempo, las perturbaciones en el proceso y la no linealidad del sistema no pueden ser toleradas cuando el crecimiento de las células no se ajustan al perfil predeterminado debido a sobrealimentación o subalimentación de nutrientes.
- **Alimentación de nutrientes de acuerdo al consumo o demanda de glucosa.** La concentración de la fuente de carbono puede ser controlada a un valor deseado si puede medirse en línea. Debido a retardos de tiempo e inestabilidad en las mediciones, generalmente se prefieren métodos que estiman y predicen la velocidad de consumo de sustrato.
- **Alimentación de nutrientes de acuerdo a la concentración de sustrato en el biorreactor o la velocidad específica de crecimiento inferida.** Aún cuando se han desarrollado algunos sensores en línea, su uso se ha impedido debido a varios problemas, entre ellos inestabilidad térmica, poca confiabilidad o alto grado de complejidad. Por ello, en este caso, se usa un modelo matemático que permita estimar estas variables a partir de otras que puedan ser medidas de manera más confiable.

- **Manipulación de la velocidad de alimentación utilizando control difuso.** Esta metodología utiliza conceptos basados en la lógica difusa, la cual se describirá en el apartado siguiente.

LACTOSUERO

La industria láctea es uno de los sectores más importantes de la economía de países industrializados y en desarrollo. Aproximadamente 90 % del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero el cual retiene cerca de 55 % del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales, por lo que constituye una fuente económica de proteínas, las cuales otorgan múltiples propiedades en muchos alimentos. Investigaciones han demostrado diversidad de usos nutricionales de este subproducto, concluyéndose que es más beneficioso emplearlo que descartarlo (Molero y otros, 2017). Sin embargo, las estadísticas indican que una importante porción de este residuo es descartada como efluente el cual crea un serio problema ambiental (Aider y otros, 2009; Fernández y otros, 2009), debido a que afecta física y químicamente la estructura del suelo, lo anterior resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto (Aider y otros, 2009).

El lactosuero es definido como “la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso” (Foegeding y Luck, 2002).

PROCESO DE OBTENCIÓN DEL SUERO DE LECHE

Durante la elaboración del queso se hace coagular la leche mediante la adición de cuajo, con ello la leche se descompone en dos partes: una masa semisólida, compuesta de caseína y un líquido, que es el suero de leche (Figura 4). El suero de leche es transparente y de color amarillo verdoso y tiene un sabor ligeramente ácido, bastante agradable.

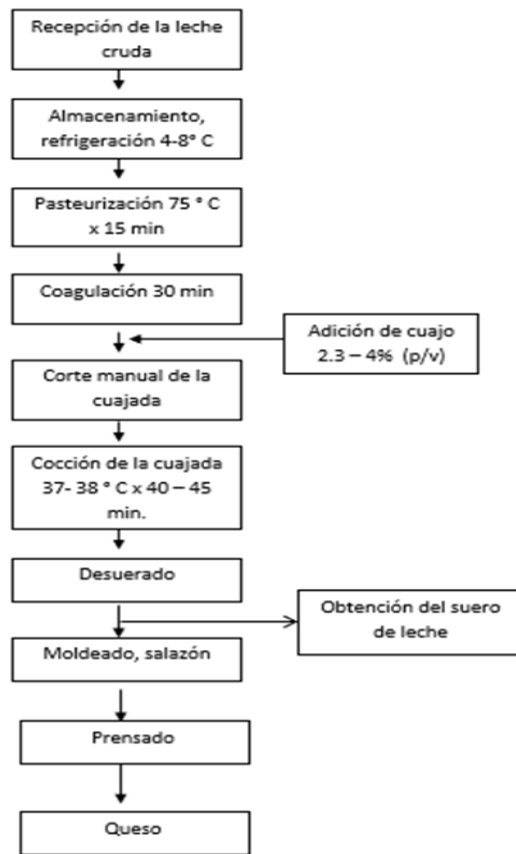


Figura 4. Flujograma para la Obtención del Suero de Leche y Queso

Fuente: Linden y Lorient (1996)

CLASIFICACIÓN DEL LACTOSUERO

Es un líquido translúcido verde obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína. Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5. El segundo llamado ácido resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos (Jelen, 2003).

En la Tabla 4, se puede detallar la composición nutricional del lactosuero dulce y ácido, observándose que el dulce tiene mayor contenido de lactosa y de proteína, respecto al ácido.

Tabla 4. Componentes del Lactosuero Dulce y Acido

Componentes	Lactosuero dulce (g/l)	Lactosuero ácido (g/l)
Sólidos totales	63,0 – 70,0	63,0 – 70,0
Lactosa	46,0 – 52,0	44,0 – 46,0
Proteínas	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Calcio	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fosfato	1,0 – 3,0	2,0 – 4,5
Lactato	2	6,4
Cloruro	1,1	1,1

Fuente: Panesar, (2007)

En cualquiera de los dos tipos de lactosuero, se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90 % del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55 % de sus nutrientes (Liu y otros, 2005). Entre los más abundantes de estos nutrientes están la lactosa (4,5-5 % p/v), proteínas solubles (0,6-0,8 % p/v), lípidos (0,4-0,5 % p/v) y sales minerales (8-10 % de extracto seco) (Muñi y otros, 2005; Londoño, 2006; Panesar y otros, 2007). Presenta una cantidad rica de minerales donde sobresale el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio. Cuenta también con vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) (Tabla 5) y ácido ascórbico (Londoño y otros, 2008).

Tabla 5. Contenido en Vitaminas del Lactosuero

Componentes	Lactosuero dulce (g/l)	Lactosuero ácido (g/l)
Tiamina	0,38	1,15
Riboflabina	1,2	1,5
Ácido nicotínico	0,85	10 - 20
Acido pantoténico	3,4	10
Pridoxina	0,42	1,5
Cobalamina	0,03	2
Ácido Abscórbito	2,2	10 - 75

Fuente: Linden y Lorient, (1996)

Este gran contenido de nutrientes genera aproximadamente 3,5 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6,8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 kg de lactosuero líquido (Muñi y otros, 2005), siendo la lactosa, el principal componente de sólidos que contribuye a la alta DBO y DQO (Ghaly y Kamal, 2004; Mukhopadhyay y otros, 2005; Koutinas y otros, 2009; Almeida y otros, 2009).

El lactosuero, aporta elementos depurativos, desintoxicantes y prebióticos, a la vez que permite acumular una buena reserva de sales minerales y vitaminas que favorecen el rejuvenecimiento interno:

*Minerales: Calcio, magnesio, manganeso, sodio, potasio y fósforo.

*Vitaminas: A, B1, B2, B3, B5, B6, C, E y D.

Además, posee componentes naturales (Beta Lactosa, Ácido Láctico L(-), Oligosacáridos e inulina), que generan un gran efecto prebiótico fundamental para mantener una flora intestinal correcta y equilibrada fundamental para el organismo (López y Prado, 2015).

NUTRIENTES DEL SUERO DE LECHE

El principal componente del suero de leche es la lactosa, un hidrato de carbono que le confiere sus propiedades más importantes. Se trata de un azúcar fácilmente asimilable por el organismo y, por ende, una buena fuente de energía. En contacto con las bacterias de la flora intestinal se transforma en ácido láctico, muy beneficioso para el metabolismo.

En cuanto a las proteínas, el suero de leche aporta dos tipos indispensables para el organismo, consideradas nutricionalmente de referencia por su contenido equilibrado en aminoácidos: la lactoglobulina y la lactoalbúmina, cuya presencia en el suero de leche es mayor que en la leche y en los huevos (Jáuregui y Welderufael, 2010; Chacón y otros, 2017).

Además, el suero de leche posee aminoácidos ramificados y potenciadores del sistema inmune que escapan intactos al proceso de la digestión y, por tanto, son capaces de retener sus valores específicos hasta ser absorbidos por la pared intestinal y asumidos por el organismo.

Por su parte, el contenido en grasa y colesterol “malo” del suero de leche es mínimo no mayor al 0,3 % en suero de leche líquido, lo cual, lo hace compatible con muchas de las dietas de adelgazamiento. También es relevante el contenido en minerales y oligoelementos: calcio, potasio, fósforo, magnesio, sodio, zinc, hierro y cobre. Posee así mismo un elevado contenido en vitaminas B y C.

UTILIZACIÓN DEL SUERO

Tradicionalmente el suero producido se ha ido empleando para la alimentación de los cerdos. Por su parte se ha tomado conciencia de su elevado valor nutritivo, tanto como para el hombre como para animal (Castillo, 2011).

También se utiliza para: alimentos de aves y cerdos, suplementario del valor nutritivo del pan, inclusión en alimentos para niños o inválidos y para alimentos dietéticos, bebidas carbónicas y bebidas fermentadas, precipitados de albúmina utilizado como suplemento del valor nutritivo de algunos elementos, preparados cosméticos y farmacéutico, fabricación de alcohol, fabricación de galactita/glucosa, fabricación de lactosa, queso de suero, ricota, requesón, entre otros., aislamiento de riboflavina, fabricación de ácido láctico para la industria general, farmacéutica o alimentaria (Baró y otros, 2001), fermentación para la fabricación de antibióticos, combustibles (metano), biomasa para la producción de alimentos o fabricación de jarabes de galactita, para pastelería o fabricación de cerveza (Elpidia, 2013).

En ese mismo sentido uno de los usos más comunes es como ingrediente en la producción de bebidas (Baccouche y otros, 2013; Varghese y otros, 2014). Éstas se caracterizan por proporcionar energía, regular la temperatura del cuerpo, evitar la deshidratación y calmar la sed (Shaikh y otros, 2001). El Lactosuero es una fuente barata de proteína y, por lo tanto, la elaboración de bebidas a base de éste, a escala comercial, tiene ventajas económicas (Shaikh y otros, 2001). Esta materia prima, altamente nutritiva, podría sustituir a la leche (Almeida y otros, 2009). Otro uso común que se le da a este subproducto en la industria alimentaria, es para la producción de requesón o queso ricotta (Cujano, 2016).

IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO

Las proteínas no constituyen la fracción más abundante, pero es la más interesante en los terrenos económico y nutricional (Linden y Lorient, 1996), como se indica en la Tabla 6. El lactosuero representa una rica y variada mezcla de proteínas secretadas que poseen amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales. Concretamente, suponen alrededor del 20 % de las proteínas de la leche de bovino (Baro y otros, 2001), siendo su principal componente la β -lactoglobulina (β -LG) con cerca de 10 % y α -lactoalbúmina con 4 % de toda la proteína láctea (Hinrichs y otros, 2004), además, contiene otras proteínas como, lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, y glicomacropéptidos conocida como la porción hidrosoluble de la Kappa-caseína (Baro y otros, 2001) y que representa entre el 20 al 25 % de la proteína disuelta en el suero (Conti y otros, 2012; Granda y otros, 2014). La β -LG es secretada en leches de rumiantes con alta resistencia a la digestión gástrica, lo que origina intolerancia y/o alergenicidad en seres humanos, sin embargo, tratamientos industriales como esterilización, calentamiento o presión hidrostática alta y la hidrólisis mejoran la digestibilidad de la β -LG presente en el lactosuero (Pescumma y otros, 2008).

Asimismo, es importante tener presente que no todos los sueros son iguales, una de las principales diferencias entre ellos está en su composición, que depende no solamente de la composición de la leche para quesería y del contenido de humedad del queso, sino de manera muy significativa del pH al cual el lactosuero se separa de la cuajada (París, 2009; Mota y Mosquera, 2015).

Tabla 6. Características Físicas y Química del Suero de Leche

Tipo	Materia Seca (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	Lactosa (%)	pH	Densidad (g/ml)	Acidez (%)
Suero de Leche dulce	6.70	0.61	0.52	4.99	6.10	densidad (15°C) del suero (1,025)	0.080 ± 0.020
Suero de leche ácido	6.42	0.54	0.60	4.39	4.10	—	0.320 ± 0.020

Fuente: Linden y Lorient, (1996)

Las proteínas de este subproducto de la industria quesera desempeñan un importante papel nutritivo como una rica y balanceada fuente de aminoácidos esenciales, aproximadamente 26 % (Ha y Zemel, 2003; Ibrahim y otros, 2005); además, son de alto valor biológico (por su contenido en leucina, triptófano, lisina y aminoácidos azufrados), tienen una calidad igual a las del huevo y no son deficientes en ningún aminoácido, esto puede ser observado en la Tabla 7, donde se relaciona el contenido de aminoácidos que contiene el lactosuero respecto al huevo, encontrándose que la leucina y lisina son los aminoácidos que se encuentran en mayor cantidad, además, parecen ejercer determinados efectos biológicos y fisiológicos, in vivo, potenciando la respuesta inmune, tanto humoral como celular (Baro y otros, 2001).

Tabla 7. Composición en Aminoácidos Esenciales (g/ 100g de proteínas)

Componentes	Lactosuero	Huevo	Equilibrio recomendado por la FAO
Treonimna	6,2	4,9	3,5
Cistaina	1	2,8	2,6
Metionina	2	3,4	2,6
Valina	6	6,4	4,8
Leucina	9,5	8,5	7
Isoleusina	5,9	5,2	4,2
Fenilalanoina	3,6	5,2	7,3
Lisina	9	6,2	5,1
Histaina	1,8	2,6	1,7

Fuente: Linden y Lorient, (1996)

APLICACIONES

Las proteínas de lactosuero son usadas ampliamente en una variedad de alimentos gracias a sus propiedades gelificantes y emulsificantes, siendo la β -lactoglobulina el principal agente gelificantes (Akhtar y Dickinson, 2007; Spahn y otros, 2008). Los geles de proteína de lactosuero pueden ser usados como hidrogeles de pH-sensitivos, el cual puede ser definido como red tridimensional que muestra la habilidad de hincharse en agua y retiene una fracción significativa de agua dentro de esta estructura (Gunasekaran y otros, 2006).

Estas proteínas han favorecido propiedades funcionales como solubilidad, (Ibrahim y otros, 2005), la emulsificación, retención de agua/grasa, espumado, espesantes y propiedades de gelificación, además, que hacen del producto un interesante ingrediente alimenticio (González y otros, 2002).

Al mismo tiempo el suero es un excelente medio de cultivo, cuya principal fuente de carbono es la lactosa, sin embargo, su uso no se limita a fermentaciones en los que se usen microorganismos capaces de metabolizar este azúcar. La lactosa se puede transformar en glucosa y galactosa, o mediante una primera fermentación, transformarla en ácido láctico, y en una segunda, utilizar el metabolito como fuente de carbono. Entre los productos que pueden ser obtenidos por fermentación del suero, se encuentran: bacterias lácticas y otros microorganismos usados en las propias queserías; ácido láctico, alcohol, vinagre, ácido propiónico; enzimas como lactasa, proteasas y pectinazas; penicilina, vitamina B2 y B12, aceite y proteína unicelular para alimento humano y de animales (Molina, 2008).

Las leches fermentadas no son solo alimento nutritivo y de gusto, sino que también representan una unidad en el sistema biológico viviente, al ser utilizadas como vehículos para los microorganismos probióticos, constituyendo de esta forma la alternativa comercial más popular hasta el momento (Iraporda, 2016).

LÓGICA DIFUSA

La lógica difusa es una de las disciplinas matemáticas que cuenta con un número creciente de aplicaciones entre las cuales se puede mencionar: la construcción de artefactos electrónicos de uso doméstico y de entretenimiento, el diseño de dispositivos artificiales de deducción automática, el diseño de sistemas de diagnóstico y de control de complejos procesos industriales, entre otros (Morales, 2002).

Asimismo, la lógica difusa se fundamenta en el concepto de que todo es cuestión de grado, lo cual permite manejar información vaga o de difícil especificación, importante para la resolución de un problema, por medio de una serie de reglas de "sentido común" que se nutren de la observación de las personas o de la formulación por parte del experto humano (Zatarain, 2011), en tal sentido la lógica difusa tiene la capacidad de reproducir de manera aceptable y eficiente los modos usuales del razonamiento humano, al considerar

que la certeza de una proposición es una cuestión de grado; por esta razón parte de la base del razonamiento aproximado y no del razonamiento preciso como lo hace la lógica clásica.

En relación con este último, la lógica difusa proporciona un medio efectivo de concebir la naturaleza aproximada e imprecisa del mundo real proporcionando los mecanismos que permiten convertir una estrategia lingüística basada en el conocimiento del experto en una estrategia automática. La experiencia muestra como los resultados de aplicación de control difuso resultan mejores que los obtenidos por técnicas convencionales, en particular cuando los procesos son demasiado complejos para ser analizados por técnicas cuantitativas convencionales, o cuando las fuentes disponibles de información son interpretadas de modo cualitativo, impreciso o incierto (Gondres y otros, 2007).

En tal sentido, la utilización de las técnicas de lógica difusa es aconsejable para resolver procesos muy complejos, es decir, cuando se carece de un modelo matemático simple o para procesos altamente no lineales, o si el procesamiento del conocimiento experto (lingüísticamente formulado) puede ser desarrollado. La lógica difusa ha sido probada para ser particularmente útil en sistemas expertos y otras aplicaciones de inteligencia artificial (Flores, 2015).

En el orden de las ideas anteriores la lógica difusa, nació en los años 60 como la lógica del razonamiento aproximado, y en ese sentido podía considerarse una extensión de la Lógica Multivaluada. Está relacionada y fundamentada en la teoría de los conjuntos difusos, desarrollada por Lotfi Zadeh (1965). Según se indica en Aguilar y Rivas (2001), en la teoría de conjuntos difusos, la pertenencia de un elemento dado obedece a una lógica multivaluada dentro del intervalo $[0,1]$ que asigna al elemento un “grado de pertenencia” (μ) que puede ir desde la no pertenencia (0) hasta la pertenencia total (1). Según esta teoría, el grado de pertenencia de un elemento a un conjunto va a venir determinado por una función de pertenencia, que puede tomar valores reales comprendidos en el intervalo $[0,1]$.

La representación de la función de pertenencia de un elemento a un conjunto difuso se representa según la Figura 5.

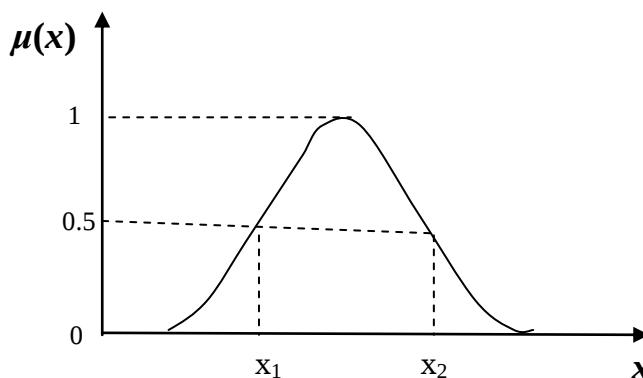


Figura 5. Función de Pertenencia de un Conjunto Difuso

Fuente: Aguilar y Rivas, (2001).

Los operadores lógicos que se utilizan en lógica difusa (Y, O, etc.) se definen también usando tablas de verdad, pero mediante un "principio de extensión" por el cual gran parte del aparato matemático clásico existente puede ser adaptado a la manipulación de los conjuntos difusos y, por tanto, a la de las variables lingüísticas.

Dados dos conjuntos difusos A y B en el mismo universo X , con funciones de pertenencia μ_A y μ_B respectivamente, se pueden definir las siguientes operaciones básicas:

- Unión:

La función de pertenencia de la unión de A y B se define como:

$$\mu_{A \cup B}(x) = \max(\mu_A(x), \mu_B(x)) \quad (1)$$

Asimismo, la unión difusa debe ser capaz de generalizar la unión clásica, ser simétrica en el orden en el que se unen los conjuntos y garantizar que un decrecimiento en el grado

de pertenencia en los conjuntos A y B no debe producir un aumento en el grado de pertenencia en $A \cup B$.

- Intersección:

La función de pertenencia de la intersección de A y B se define como:

$$\mu_{A \cap B}(x) = \min(\mu_A(x), \mu_B(x)) \quad (2)$$

- Complemento:

La función de pertenencia del complemento de A se define como:

$$\mu_{\bar{A}}(x) = 1 - \mu_A(x) \quad (3)$$

La operación más importante para el desarrollo y creación de Reglas Lógicas es la implicación, simbolizada por " $\rightarrow$ " que representa el "Entonces" de las reglas heurísticas: Si (...) Entonces (...).

En la lógica difusa hay muchas maneras de definir la implicación. Se puede elegir una "función (matemática) de implicación" distinta en cada caso para representar a la implicación.

Una característica de los sistemas lógicos es el procedimiento de razonamiento, que permite inferir resultados lógicos a partir de una serie de antecedentes. Generalmente, el razonamiento lógico se basa en silogismos, en los que los antecedentes son por un lado las proposiciones condicionales (las reglas), y las observaciones presentes por otro (las premisas de cada regla).

Los esquemas de razonamiento utilizados son "esquemas de razonamiento aproximado", que intentan reproducir los esquemas mentales del cerebro humano en el

proceso de razonamiento. Estos esquemas consistirán en una generalización de los esquemas básicos de inferencia en lógica binaria (silogismo clásico).

Tan importante será la selección de un esquema de razonamiento como su representación material, ya que el objetivo final es poder desarrollar un procedimiento analítico concreto para el diseño de controladores difusos y la toma de decisiones en general.

Una vez que se disponga de las representaciones analíticas de cada uno de los elementos lógicos que se acaban de enumerar, se estará en disposición de desarrollar formalmente un controlador "heurístico" que permita inferir el control adecuado de un determinado proceso en función de un conjunto de reglas "lingüísticas", definidas de antemano tras la observación de la salida y normas de funcionamiento.

Los conjuntos clásicos se definen mediante un predicado que da lugar a una clara división del universo de discurso X en los valores "Verdadero" y "Falso". Sin embargo, el razonamiento humano utiliza frecuentemente predicados que no se pueden reducir a este tipo de división: son los denominados predicados vagos.

Para operar en la práctica con la lógica difusa se suelen emplear conjuntos difusos con formas de funciones parametrizables, tales como las mostradas en la Figura 6, en la cual se pueden observar dos conjuntos difusos, uno tipo triangular, y el otro con forma de campana Gaussiana. En este propósito conceptualmente existen dos aproximaciones para determinar la función característica asociada a un conjunto: la primera aproximación está basada en el conocimiento humano de los expertos, y la segunda es utilizar una colección de datos para diseñar la función.

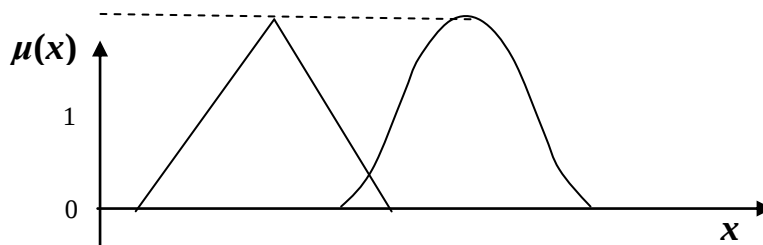


Figura 6. Conjuntos Difusos de Tipo Triangular y Gaussiano
Fuente: Aguilar y Rivas (2001).

SISTEMAS DE INFERENCIAS DIFUSAS

Los sistemas de inferencias difusas constituyen un marco de trabajo de computación basado en los conceptos de teoría de conjuntos difusos, reglas si-entonces y razonamiento difuso (Jang y otros, 2001). Son sistemas que usan la teoría de conjuntos difusos para mapear entradas a salidas. Con el término “mapear” se quiere significar el establecer una correspondencia que asocia a cada elemento de un primer conjunto con un único elemento de un segundo conjunto, en esencia es una forma de representar conocimientos y datos inexactos en forma similar a como lo hace el pensamiento humano. Asimismo, define una correspondencia no lineal entre una o varias variables de entrada y una variable de salida; esto proporciona una base desde la cual pueden tomarse decisiones o definir patrones. El proceso de inferencia difusa involucra el uso conceptos tales como funciones de membresía, operadores de lógica difusa, reglas difusa si-entonces y razonamiento difuso.

La estructura básica de un sistema de inferencia difusa consiste de 3 componentes conceptuales (Wang, 1994):

- Una base de reglas; que contiene una selección de reglas difusas.
- Una base de datos (o diccionario) que define las funciones de membresía usadas en las reglas difusas.

- Un mecanismo de razonamiento, que realiza el procedimiento de inferencia sobre las reglas y hechos dados, para derivar una salida o conclusión deseada.

Los sistemas de inferencia difusa han sido aplicados en diferentes campos, tales como control automático, clasificación de datos, sistemas expertos y reconocimiento de patrones. Es conocido también con otras denominaciones, tales como sistema basado en reglas difusas, sistema experto difuso, controlador lógico difuso.

Se han desarrollado varios modelos de sistemas difusos, entre ellos el de Mamdani y el de Sugeno (Mamdani, 1974; Sugeno, 1985). Estos modelos se basan en un conjunto de reglas heurísticas donde las variables lingüísticas de las entradas y salidas se representan por conjuntos difusos.

El proceso de inferencias difusas sobre un conjunto de reglas, con el mismo dominio de consecuentes de discurso, para producir una única consecuencia tiene dos soluciones básicas: derivar el consecuente de cada regla, y combinar el conjunto de los consecuentes; o combinar las reglas en una regla integrada, y el uso de la regla integrada para derivar un único consecuente (Diciembre, 2017).

La Figura 7 muestra un modelo de inferencias difusas que cuenta con interfaz de difusificación, base de conocimiento, motor de inferencia e interfaz de desdifusificación. Adicionalmente la aplicación de modelos basados en lógica difusa permite abordar de manera efectiva la creación de sistemas soporte para la toma de decisiones ya que brinda la capacidad de extraer datos de forma práctica, y a través de las capacidades analíticas y la experiencia de los evaluadores, descubrir relaciones significativas entre ellos. Los modelos de lógica difusa son altamente flexibles, más tolerantes a la imprecisión de los datos y pueden trabajar con funciones no lineales de diversa complejidad, así mismo no están obligados por presunciones estadísticas acerca de las características de los datos y sus distribuciones de probabilidad y se les puede modificar fácilmente dependiendo de la solución requerida del problema.

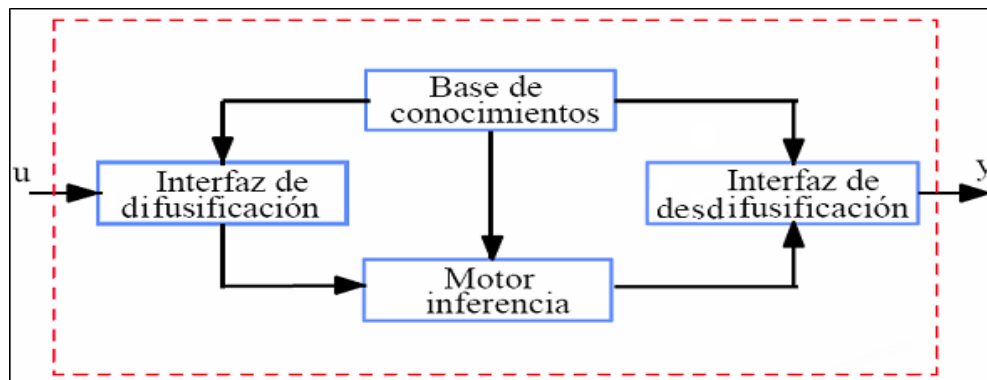


Figura 7. Componentes de un Modelo Difuso Lingüístico

Fuente: Lee, (1990)

- **INTERFAZ DE DIFUSIFICACIÓN:** este elemento transforma las variables de entrada del modelo (u) en variables difusas. Para esta interfaz se deben tener definidos los rangos de variación de las variables de entrada y los conjuntos difusos asociados con sus respectivas funciones de pertenencia.
- **BASE DE CONOCIMIENTOS:** contiene las reglas lingüísticas del control y la información referente a las funciones de pertenencia de los conjuntos difusos. Estas reglas lingüísticas, tienen típicamente la forma Si – Entonces,

Ejemplo:

Si x_1 es A y x_2 es B , entonces y es C

Donde A , B y C son los conjuntos difusos de las variables de entrada x_1, x_2 y de la variable de salida y respectivamente. Existen varias formas de derivar las reglas (Lee, 1990), entre las que destacan las basadas en:

- La experiencia de expertos y el conocimiento de ingeniería de control.

La base de reglas se determina a partir de entrevistas con el operador o a través del conocimiento de la dinámica del proceso.

➤ El modelado del proceso.

Los parámetros de la base de conocimiento se obtienen a partir de datos de entrada y salida del proceso.

- **MOTOR DE INFERENCIA:** realiza la tarea de calcular las variables de salida a partir de las variables de entrada, mediante las reglas del controlador y la inferencia difusa, entregando conjuntos difusos de salida. Por ejemplo, dada una base de conocimiento con n reglas del tipo:

Si x_1 es A_i y x_2 es B_i , entonces y es C_i

La secuencia de cálculos que realiza el motor de inferencia incluye:

Determinar el grado de cumplimiento W_i de cada regla a partir de los grados de pertenencia de las variables de entrada obtenidos en la etapa de desdifusificación, es decir:

$$W_i(x) = \min(\mu_{A_i}(x), \mu_{B_i}(x)) \quad (4)$$

Debido a que las premisas de las reglas están unidas por operadores **AND (y)**, definidos como la intersección de conjuntos difusos.

Para cada regla se tiene una consecuencia “ y es C_i ”, que tiene asociada una función de pertenencia μ_{C_i} . Por lo tanto, se tiene un conjunto de salida C'_i , cuya función de pertenencia es:

$$\mu_{C'_i}(x) = \min(W_i, \mu_{C_i}(x)) \quad (5)$$

Donde W_i es el grado de cumplimiento para la regla i .

Para evaluar el conjunto total de reglas, se unen los conjuntos difusos C'_i resultantes de cada regla, generándose un conjunto de salida con la siguiente función de pertenencia:

$$\mu_{C'}(x) = \max \left(\mu_{C'_i}(x) \right)_{i=1}^n \quad (6)$$

De esta forma, se obtiene una salida difusa del controlador, con una función de pertenencia $\mu_{C'}$.

- **INTERFAZ DE DESDIFUSIFICACIÓN:** este elemento provee salidas discretas y determinísticas a partir de los conjuntos difusos C' obtenidos como resultado de la inferencia. Existen diferentes métodos de desdifusificación, algunos de los cuales se describen a continuación:
 - Método del máximo. La salida corresponde al valor para el cual la función de pertenencia $\mu_{C'}$ alcanza su máximo.
 - Media del máximo. La salida es el promedio entre los elementos del conjunto C' que tienen un grado de pertenencia máximo.
 - Centro de área. Genera como salida el valor correspondiente al centro de gravedad de la función de pertenencia del conjunto de salida C' .

CONTROL DIFUSO

Los sistemas de control difuso permiten describir el conjunto de reglas que utilizaría un ser humano que controla un proceso, con la imprecisión que poseen los lenguajes naturales. A partir de estas reglas, generan las acciones que realizan el control.

El control difuso establece el algoritmo de control del proceso como un conjunto de relaciones difusas entre las variables $x_1, x_2, \dots$, que condicionan el proceso que va a ser controlado, y la entrada “y” al propio proceso. El algoritmo de control se da como un conjunto de expresiones:

SI condiciones ENTONCES acciones en las que las variables $x_1, x_2, \dots$,

Por ejemplo:

SI x_1 es pequeño Y x_2 es grande ENTONCES y es medio

SI x_1 es pequeño Y x_2 es medio ENTONCES y es grande

Estas expresiones son las reglas de control difuso. La parte izquierda de la regla es el antecedente y la parte derecha es el consecuente. En general las variables de condición $x_1, x_2, \dots$, son las entradas del sistema de control y la variable “y” es la salida del mismo.

Las palabras pequeño, grande y medio son valores difusos que toman las variables difusas x_1, x_2 e y, los cuales se definen mediante conjuntos difusos.

Los controladores difusos están formados por grupos de reglas y actúan de la forma siguiente: cuando se les proporciona el valor actual de las variables de entrada se obtiene el valor de las variables de salida, calculado mediante un método de inferencia difusa. Teniendo en cuenta que los sistemas de control deben actuar en tiempo real, los métodos de inferencia que se usan deben tener una programación algorítmica que garantice respuesta instantánea.

La Figura 8 muestra gráficamente un sistema constituido por un proceso regulado con un controlador difuso.

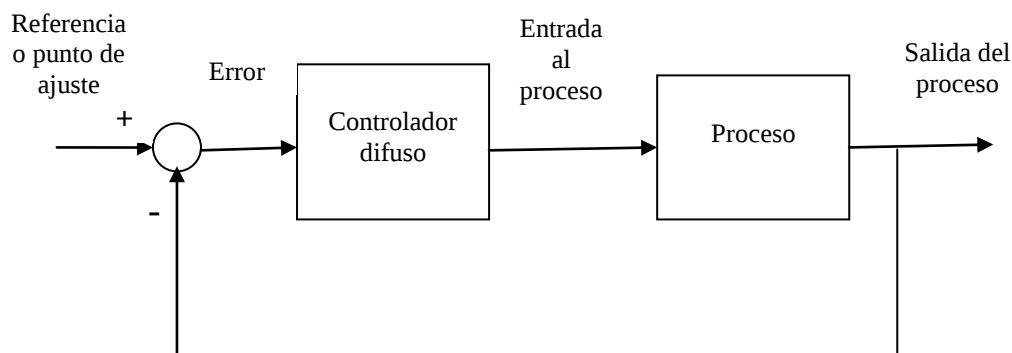


Figura 8. Esquema de un Sistema con Controlador Difuso.

Fuente: Passino y Yurkovich (1998).

En la mayoría de los casos, los valores nítidos de los datos medidos son primeramente normalizados y convertidos a valores lingüísticos tales como “alto” o “bajo”, “grande” o “pequeño”. En procesos de una entrada y una salida, usualmente se usan dos clases de variables para realizar el control: el error (E) y el cambio de error (CE).

La Figura 9, muestra esquemáticamente un ejemplo de un controlador difuso, indicando en un diagrama de bloques las acciones internas realizadas por dicho controlador. La determinación de las acciones de control emplean tres pasos principales: difusificación, razonamiento y desdifusificación. La difusificación corresponde a la acción de convertir un valor nítido a su forma difusa, es decir donde los datos de entrada son procesados para calcular el grado de membresía que tendrán dentro del controlador. El razonamiento es el procedimiento de evaluar las reglas difusas o etapa donde se realiza la toma de decisiones que dictarán la forma en que actuará el sistema. La desdifusificación consiste en convertir

los valores difusos en equivalentes nítidos, la misma se corresponde con la etapa del procesado final donde se adecuan los valores difusos obtenidos de la inferencia en valores no difusos útiles para el proceso que se ha de controlar (Zadeh, 1975; Lee y otros, 2000).

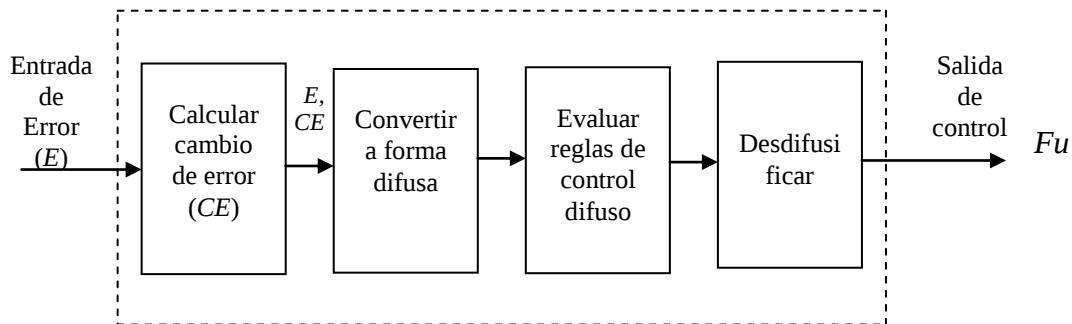


Figura 9. Ejemplo de Controlador Difuso.

Fuente: Lee y otros, (2000).

El éxito que pueda lograrse en las aplicaciones de control difuso en los procesos depende en gran medida del universo de discurso seleccionado para el sistema, así como las funciones de membresía y variables lingüísticas desarrolladas a fin de obtener las reglas que determinan el comportamiento requerido para el proceso a controlar.

EFICIENCIA

Se caracteriza por estar asociada a la capacidad para seleccionar y usar los medios más efectivos y de menor desperdicio con el fin de llevar a cabo una tarea o lograr un propósito, en pocas palabras es el grado en que se cumplen los objetivos de una iniciativa al menor costo posible. El no cumplir cabalmente los objetivos y/o el desperdicio de recursos o insumos hacen que la iniciativa resulte ineficiente (o menos eficiente) (Mokate, 1999).

Asimismo, la eficiencia contempla el empleo de los medios de tal forma que satisfagan un máximo cuantitativo o cualitativo de fines o necesidades. Consiste en un buen

uso de los recursos, en lograr lo mayor posible con aquello que se tiene a la disposición, permitiendo relacionar los esfuerzos frente a los resultados que se obtengan (Mejía, 1998). Si se obtienen mejores resultados con menor gasto de recursos o menores esfuerzos, se habrá incrementado la eficiencia. Esto es alcanzar los objetivos por medio de la elección de alternativas que pueden suministrar el mayor beneficio (Lam y Hernández, 2008). Es la relación resultados / recursos bajo condiciones reales y se expresa por la fórmula:

$$Eficiencia = \frac{Resultados}{Recursos} \quad (7)$$

EFICACIA

La eficacia según Bouza (2000), se refiere a los resultados en relación con las metas (consecución) y cumplimiento (logro) de los objetivos (Quijano, 2006). Para ser eficaz se deben priorizar las tareas y realizar ordenadamente aquellas que permiten alcanzarlos mejor y más. Es el grado en que un procedimiento o servicio puede lograr el mejor resultado posible. Es la relación resultado alcanzado / resultado previsto bajo condiciones ideales y se expresa por la fórmula:

$$Eficacia = \frac{Resultado alcanzado}{Resultado previsto} \quad (8)$$

Adicionalmente cuando se crean condiciones de máximo acondicionamiento para alcanzar un fin y éste se logra, los recursos puestos en función de este fin se denominan eficaces (Lam y Hernández, 2008), debido a que es posible determinar el grado en que las salidas actuales se corresponden con las salidas deseadas (Mallo y Merlo, 1995; Rojas y otros, 2018).

Por su parte Mejía (1998) la define como el grado en que se logran los objetivos y las metas de un plan es decir cuánto de los resultados esperados se alcanzó. Consiste en

concentrar los esfuerzos de una entidad en las actividades y procesos que realmente deben llevarse a cabo para el cumplimiento de los objetivos formulados, de todo esto se desprende que para lograr total claridad sobre la eficacia, hace falta precisar lo que constituye un “objetivo”. Particularmente, se necesita un objetivo bien definido debido a que explicita lo que se busca generar, incluyendo la calidad de lo que se propone. Asimismo, un objetivo debe delimitar el tiempo en que se espera generar un determinado efecto o producto. Por tanto, una iniciativa resulta eficaz si cumple los objetivos esperados en el tiempo previsto y con la calidad esperada (Mokate, 1999).

EFFECTIVIDAD

La efectividad en una investigación busca que los objetivos planteados sean trascendentes y éstos se alcancen (Gutiérrez, 2014), es por ello que centra su atención en los efectos de una actividad y sus resultados finales, beneficios y consecuencias para una población en relación con los objetivos establecidos (Lam y Hernández, 2008), lo cual se traduce en el óptimo empleo y uso racional de los recursos disponibles (materiales, dinero, personas), en la consecución de los resultados esperados. Asimismo puede ser representada como la óptima relación existente entre los productos, servicios o resultados alcanzados y el uso que se hace de los recursos, permitiendo conocer si la inversión efectuada fue útil, es decir, si sirvió para satisfacer la necesidad que inicialmente motivó el destino de recursos.

“La verdad se robustece con la investigación y la dilación; la falsedad, con el apresuramiento y la incertidumbre.” Tacito

MARCO METODOLÓGICO

En este capítulo se presentan las técnicas y los instrumentos que fueron utilizados para llevar a cabo la investigación; está referido al momento que alude al conjunto de procedimientos lógicos, tecno-operacionales implícitos en todo proceso de investigación, con objeto de ponerlos de manifiesto y sistematizarlos. (Balestrini, 2006)

ENFOQUE EPISTEMOLÓGICO

Para Piaget, la epistemología “es el estudio del pasaje de los estados de menor conocimiento a los estados de un conocimiento más avanzado” (Piaget, 1979, p. 16), en tal sentido de forma simple, sencilla y breve puede ser enfocada bajo tres conceptos principales: conocimiento, ciencia e investigación científica (Cortés y Gil, 1997), que conjugados de manera apropiada generan ideas nuevas capaces de ser expresadas en teorías, que son señaladas como verdaderas (Navarro, 2014).

En igual forma, “el término epistemología deriva del griego episteme que significa conocimiento, y es una rama de la filosofía que se ocupa de todos los elementos que procuran la adquisición de conocimiento e investiga los fundamentos, límites, métodos y validez del mismo” (Ceberio y Watzlawick, 1998, p.10).

Asimismo, para autores como Thuillier (1992) y Kuhn (2001), la epistemología es aquella parte de la ciencia que tiene como objeto (no el único) hacer un recorrido por la historia del sujeto respecto a la construcción del conocimiento científico; es decir, la forma cómo éste ha objetivado, especializado y otorgado un status de científicidad al mismo; pero a su vez, el reconocimiento que goza este tipo de conocimiento por parte de la comunidad científica. Es aquella epistemología que estudia la génesis de las ciencias; que escudriña cómo el ser humano ha transformado o comprendido su entorno por la vía de métodos

experimentales o hermenéuticos en el deseo o necesidad de explicar fenómenos en sus causas y en sus esencias. (Jaramillo, 2003)

La presente investigación se encuentra enmarcada bajo el paradigma del pragmatismo, en el que la práctica o el hacer es una actividad humana que nutre de contenidos, significados y permite identificar lo que se conoce y lo que no. En él la experiencia es la que permite conocer y comprender las situaciones del día a día y es la que configura para ver una realidad, por lo que cada concepto teórico que se asume como una verdad tiene una expresión en la práctica (Morrison, 2015).

En consecuencia para los pragmatistas las teorías eran instrumentos en lugar de respuestas a enigmas y en su modelo la producción del conocimiento debía comenzar con problemas prácticos, donde los objetos del conocimiento eran definidos por operaciones activas, y el conocimiento era un producto de la acción humana (Hurtado, 2012), fundamentado en que el pensamiento evoluciona y dota de infinitas posibilidades a los seres humanos para construir constantemente un mejor mundo.

En este propósito esta investigación busca introducir los conceptos de la lógica difusa a fin de reproducir de manera simple y aceptable los modos usuales del razonamiento humano (modelaje de sistemas complejos) y determinar su contribución en la producción eficiente, eficaz y efectiva de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, con el menor costo posible, con gran exactitud, en el menor tiempo, sin desperdiciar recursos materiales, aprovechando y otorgándole un valor agregado a un subproducto de la manufactura del queso (lactosuero), que produce un impacto negativo al ambiente y que favorece el crecimiento de un microorganismo que ha demostrado inhibir el desarrollo de bacterias patógenas, mejorando la calidad de vida de los seres humanos, con el criterio pragmático donde la intervención de la inteligencia y la relevancia de las ideas y teorías modifican el curso del mundo.

TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

TIPO DE INVESTIGACIÓN

En una investigación se define con base en el objetivo general (Hurtado, 2012) y señala el alcance que el investigador espera obtener con el estudio, a fin de establecer su contribución. Tomando como base lo anteriormente expuesto y en atención a las características que presenta esta investigación y a sus objetivos, la misma se encuentra dentro de la modalidad de investigación proyectiva, pues pretende determinar la contribución de la lógica difusa como alternativa de control en la producción semicontinua eficiente, eficaz y efectiva de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

En ese mismo sentido la investigación proyectiva consiste en la elaboración de una propuesta, un plan, un programa, un procedimiento, entre otros; como solución a un problema o necesidad de tipo práctico, ya sea de un grupo social, de una institución, o de una región geográfica, en un área particular del conocimiento, a partir de un diagnóstico preciso de las necesidades del momento, de los procesos explicativos involucrados y de las tendencias futuras (Hurtado, 2012). Este holotipo de investigación es el que abarca el campo de la tecnología, pues esta aborda problemas prácticos, se centra en aplicaciones concretas, en dar respuesta al cómo hacer las cosas, inspirada en los procesos de investigación (Rietveld y otros, 2006; Hurtado, 2012).

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El diseño de la investigación es el planteamiento de una serie de actividades sucesivas y organizadas que debe adaptarse a las particularidades de cada investigación y que indican los pasos, pruebas a efectuar y las técnicas a utilizar para recolectar y analizar datos (Tamayo, 2004). Asimismo, el diseño de investigación se define con base en el procedimiento; en la manera como el investigador recolecta la información necesaria para

dar respuesta a su pregunta de investigación (o para lograr su objetivo general), de la forma más rigurosa posible (Hurtado, 2012).

Con referencia a lo anterior los diseños representan esos procedimientos más específicos dentro de cada holotipo de investigación, que indican qué observaciones se deben hacer, dónde hacerlas, cómo registrarlas, cuántas observaciones hacer, que tipo de análisis debe aplicarse y que conclusiones podrán obtenerse a partir del análisis de los resultados (Arnau, 1980; Hurtado, 2012). Dadas las condiciones que anteceden, esta investigación centrará su atención en un diseño de investigación experimental, en la que se manipularán deliberadamente una o más variables de entrada (factores), a fin de medir su impacto en una serie de variables de salida (o de respuesta) para analizar el comportamiento de la producción de la *Saccharomyces boulardii*.

En este propósito el diseño experimental representa el plan, estructura o estrategia para el estudio preciso de un evento, siempre que cumpla dos condiciones básicas, manipulación y aleatorización (Kerlinger y Howard, 2001), aunque algunos autores indican que no es una limitante porque también es considerado diseño cuando el investigador utiliza otros controles de variable con cierta rigurosidad (Hurtado, 2012).

Hecha la observación anterior, en la investigación se empleó el diseño de experimento Hipercubo Latino (Latin Hypercube), porque maximiza la distancia mínima entre los puntos de diseño (igual espaciamiento de los niveles de cada factor), produciendo uno que imita la distribución uniforme y que resulta en un diseño de muestreo económico, pero robusto (Ávila, 2018), que es usado generalmente cuando las medidas de las respuestas se hacen difíciles y costosas de supervisar por el montaje instrumental o porque la experimentación en laboratorio o en la industria del proceso resulta compleja.

Asimismo, el diseño Latin Hypercube Designs (LHD), se recomienda implementar, si:

a. Se espera que la respuesta dependa sólo de algunos de los insumos (factor de escasez); los puntos deben estar espaciados de manera uniforme cuando se proyecta en la región experimental en estos factores.

b. Se asume modelo aditivo (aproximadamente); también se quiere un diseño cuyos puntos se proyecten de manera uniforme sobre los valores de entradas individuales; se puede demostrar que (al menos en algunos supuestos), LHD son mejores que diseños de igual tamaño, obtenidos de un muestreo aleatorio simple.

En tal sentido, en la investigación se manipularon las variables independientes que para efectos de esta exploración se encontraban representadas por los factores experimentales, y provocaron directamente cambios en el evento (producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*) para observar después las consecuencias, empleando para ello otros controles de variable con cierta rigurosidad a fin de establecer la contribución de la lógica difusa en eventos de este tipo. En este propósito los factores experimentales que se muestran en la tabla 8, corresponden en primer lugar a investigaciones previas realizadas por la autora donde se logró determinar los niveles de sustrato que generan mayor producción del microorganismo (Crespo, 2012) y las pruebas piloto (experimentación preliminar) que permitieron observar el comportamiento de la temperatura y la velocidad de agitación.

Tabla 8. Niveles o Dosis Naturales para los Factores Experimentales

Factor	Nivel mínimo	Nivel máximo
X_1 : Concentración de sustrato (%)	10	25
X_2 : Temperatura (°C)	35	40
X_3 : Velocidad de Agitación (rpm)	100	400

Fuente: Autor, (2020)

Adicionalmente, en función al lugar donde el investigador obtiene los datos, la investigación contó con un diseño de tipo laboratorio, debido a que permite aislar los eventos de estudio y ejercer un mayor control sobre ellos (Tabla 9), al mismo tiempo que facilita la manipulación, aleatorización y el control de las variables extrañas (Hurtado, 2012).

Tabla 9. Matriz “D” de diseño de tratamientos codificada, Hipercubo Latino para 3 factores experimentales, para las respuestas Biomasa, pH, SST, Potencial óxido Reducción (POR), Tiempo de latencia y Tiempo de máx. ufc (máxima biomasa)

Nº trat	Factores Experimentales			Respuestas					
	X1 (%)	X2 (°C)	X3 (rpm)	Y1 (ufc)	Y2 ([+])	Y3 (brix)	Y4 (mv)	Y5 (h)	Y6 (h)
1	23,85	38,46	308	.	.	.	.	.	.
2	13,46	38,85	100	.	.	.	.	.	.
3	14,62	35,38	285	.	.	.	.	.	.
4	12,31	37,31	377	.	.	.	.	.	.
5	20,38	36,92	400	.	.	.	.	.	.
6	18,08	40	192	.	.	.	.	.	.
7	15,77	39,62	354	.	.	.	.	.	.
8	11,15	36,54	169	.	.	.	.	.	.
9	16,92	37,69	262	.	.	.	.	.	.
10	19,23	35,77	123	.	.	.	.	.	.
11	25	36,15	215	.	.	.	.	.	.
12	10	39,23	238	.	.	.	.	.	.
13	21,54	38,08	146	.	.	.	.	.	.
14	22,69	35	331	.	.	.	.	.	.

Fuente: Autor, (2020)

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, POBLACIÓN Y MUESTRA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

Es por lo general la unidad organizativa en donde tiene lugar el problema; pudiendo sin embargo, hacerse extensiva a cualquier situación a mejorar dentro de la realidad organizacional: proyectos, programas, entre otras, (Mendoza, 2015). Tomando como base lo descrito anteriormente, la investigación se llevó a cabo en el laboratorio de investigación (Ingeniería y tecnología de alimento LITA), de la UNELLEZ del Vicerrectorado de

Infraestructura y Procesos Industriales (VIPI), en la ciudad de San Carlos del Estado Cojedes- Venezuela (ver Anexo 1).

POBLACIÓN

En una investigación desde el punto de vista estadístico una población o universo puede estar referido a cualquier conjunto de elementos de los cuales se pretende indagar y conocer sus características o una de ellas y para el cual serán validadas las conclusiones obtenidas en la investigación (Balestrini, 2006). Significa entonces, que comprende “la totalidad del fenómeno a estudiar donde las unidades de población poseen una característica en común, la cual se estudia y da origen a los datos de la investigación” (Tamayo, 2004, p.114). Partiendo de esta premisa la población estuvo constituida por 1500 ml, que representa la capacidad del biorreactor, con un total de 14 tratamientos.

MUESTRA

Una muestra estadística según Balestrini (2006), es una parte de la población, o un número de individuos u objetos seleccionados científicamente, cada uno de los cuales es un elemento del universo; es decir, la muestra es obtenida con el fin de investigar, a partir del conocimiento de sus características particulares, las propiedades de una población.

Basándose en la definición anterior y en las normas COVENIN 1337-90, 3123:1994, 1126:89 y las ISO 4833-1:2013(E) para el recuento de microorganismos, la investigación contó con una muestra para cada tratamiento de 25 ml del sustrato, inoculado cada hora por un lapso de 12 horas por corrida, a fin de que el subconjunto fuese representativo de la población de microorganismos de *Saccharomyces boulardii*.

TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica es el procedimiento o forma utilizada por el investigador para obtener datos o información requerida, (Arias, 2012). Por lo que se puede inferir que las técnicas son particulares y específicas de una disciplina, sirven de complemento al método científico y además están relacionadas con la operacionalización que se hace de las variables, todo con el firme propósito de recabar la información necesaria para el logro de los objetivos de la investigación.

Partiendo de estas premisas se utilizó como técnica la observación directa que es aquella realizada cuando el problema se ha definido claramente, a fin de permitir un estudio preciso de los patrones de comportamiento que se quieren observar y medir (Carrillo, 2011). Asimismo, esta investigación tomó en consideración los fundamentos de la observación de tipo estructurada con el objetivo de describir sistemáticamente el fenómeno de estudio con la ayuda de elementos técnicos apropiados o guías diseñadas previamente, en la que se especificaron los elementos que fueron observados, en tal sentido resultó apropiado el uso de tablas, donde se registraron las variables importantes para la producción de *Saccharomyces boulardii* (sólidos totales, unidades formadoras de colonias, entre otras,) de forma ordenada, permitiendo explotar los fundamentos de la observación sistemática.

En igual forma, las observaciones pueden ser clasificadas según método utilizado como instrumentadas, motivado a que emplean equipos mecánicos y electrónicos para captar el evento de estudio (electrodos de pH, termómetros, microscopios, entre otros), en un lugar preestablecido (LITA) con grupos humanos previamente determinados, con el fin de obtener información sobre el comportamiento (crecimiento) de los microorganismos en el biorreactor (ver anexo 1).

Por las consideraciones anteriores se aprovecharon los conocimientos aportados por observación directa de fuente primaria, debido a que la misma recolectó la información a través de un contacto inmediato con el objeto de análisis, en igual forma se empleó la observación directa de fuentes secundarias, donde el investigador recogió información a partir de investigaciones hechas con propósitos diferentes o provenientes de libros, estadísticas, entre otros; (Hernández y otros, 2010) de manera de describir el proceso de cultivo de levaduras de la especie *Saccharomyces boulardii* y todo lo relacionado con el estado del arte sobre el modelado, simulación y control difuso para biorreactores semicontínuos.

Sobre la base de las ideas plasmadas anteriormente, se empleó también como técnica el modelado y simulación. Según Hurtado (2012) estas técnicas son recomendables utilizarlas cuando se requiere reproducir un evento o situación, mediante un modelo que permita modificar arbitrariamente las variables que lo conforman, y observar las consecuencias de tales modificaciones, por lo que la simulación requiere que los modelos permitan conectar los aspectos teóricos de una situación con sus consecuencias en la realidad, de modo que establezcan una representación formal del sistema real, con lo que se pretendió aumentar su comprensión, hacer predicciones y ayudar a su control.

En ese mismo orden y dirección fue propicio el uso de diagramas, algoritmos, fórmulas y relaciones matemáticas, entre otros; con el fin de establecer el registro del fenómeno en estudio, que permitió la interpretación de los resultados y la toma de decisiones posteriores.

Dadas las condiciones que anteceden se hace necesario definir los instrumentos de recolección de datos, que representaron los recursos de que puede valerse el investigador para acercarse a los fenómenos y extraer de ellos información. De este modo el instrumento sintetiza en si toda la labor previa de la investigación, resume los aportes del marco teórico al seleccionar datos que corresponden a los indicadores y, por lo tanto a las variables o

conceptos utilizados (Sabino, 1992), en esencia constituyen la herramienta mediante la cual es posible aplicar una determinada técnica de recolección de información (Hurtado, 2012). Tomando como base lo anterior y partiendo de que los instrumentos son un mecanismo recopilador de datos amplio, variado, representan los soportes que justifican y de alguna manera le dan validez a la investigación, se empleó la guía de observación para el proceso de medición de los sólidos solubles totales ($^{\circ}$ Brix), pH y temperatura, los cuales se cuantificaron en intervalos de tiempo de 1 hora, desde la hora de inicio (h_0) hasta la hora final (h_{12}), también se utilizaron para el conteo de la biomasa de *Saccharomyces boulardii* los formatos que se especifican en el plan de calidad FPC-001 (Plan de la calidad para la producción de biomasa de *saccharomyces boulardii*) mostrados en el anexo 1, a fin de registrar la ocurrencia o frecuencia de comportamientos o eventos y sus características. En este plan de calidad también se especificaron los instrumentos de medición para dichas variables de control como lo son termocupla, contador de placas, electrodo de pH, entre otros (Crespo, 2014).

VALIDEZ Y CONFIABILIDAD DE LOS INSTRUMENTOS

VALIDEZ

La validez en términos generales, se refiere al grado en que un instrumento realmente mide la variable que se quiere evaluar (Hernández y otros, 2014). Para determinar la validez del instrumento guía de observación, se sometió el mismo al juicio de expertos relacionados con la temática de investigación, una vez se obtenida la evaluación de los expertos, se procedió a contrastar las opiniones y se modificó según sugerencias, para ello se justificó a través de la revisión de textos que indican que la evaluación debe tomar como criterio que el instrumento refleje la definición teórica de las variables que se pretenden medir; es decir, la operacionalización de las variables y que pueda representar el dominio o universo de contenido de las propiedades que se desean medir, entre otros.

Por su parte los instrumentos de medición registraron datos observables que representaron los conceptos o variables que intervienen en el proceso de producción de *Saccharomyces boulardii*.

CONFIABILIDAD

La confiabilidad de un instrumento de medición se refiere al grado en que su aplicación repetida al mismo sujeto u objeto, produce iguales resultados (Dasilva, 2009; Hernández y otros, 2014).

En ese mismo sentido, para determinar la confiabilidad del instrumento se realizaron mediciones por triplicado durante cada hora de corrida experimental y luego se compararon con los valores obtenidos a través del toolbox Simulink de Matlab, a fin de que se puedan detectar dificultades en la ejecución de las pruebas o corridas, que se traducen en errores de medición, propios de la técnica de observación directa y que al ser controlados permiten que los resultados arrojados por el instrumento puedan ser interpretables; es decir, que tengan significado.

TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE INFORMACIÓN

El propósito del análisis de los datos o información implica el establecimiento de categorías, la ordenación y manipulación de los datos para resumirlos y poder sacar algunos resultados en función de las interrogantes de la investigación (Balestrini, 2006). Por su parte las técnicas de procesamiento se refieren a la técnica dirigida a la cuantificación y clasificación de las ideas de un texto, mediante categorías preestablecidas (Arias, 2012). De lo anteriormente expuesto el conjunto de datos obtenidos, a través de las técnicas empleadas para el levantamiento de información y uso de instrumentos de recolección de datos, fue clasificado, verificado y cotejado. Se realizó el análisis bajo la aplicación de los

conceptos teóricos y definiciones propias del sistema, a fin de conocer el comportamiento y tendencias del proceso.

Al mismo tiempo el conjunto de datos obtenidos se procesó mediante el uso de métodos numéricos y el programa SAS JMP 8 del módulo de regresión de superficie de respuesta para la obtención del modelo probabilístico o poblacional de las unidades formadoras de colonias (biomasa de *Saccharomyces boulardii*), sólidos solubles totales (°Brix), pH, tiempo de latencia y tiempo máximo crecimiento (máxima biomasa). En este propósito se usó en principio un diseño estadístico de superficie de respuesta “Virtual Space Filling”, del tipo Hípercubo Latino Optimal debido a que maximiza la distancia mínima entre los puntos de diseño (igual espaciamiento de los niveles de cada factor) y produce diseños que imitan la distribución uniforme.

Para la optimización operativa se empleó el módulo de perfiles de respuesta y de deseabilidad, junto con el simulador del programa SAS JMP, apoyado en los modelos de regresión basados en Redes Neuronales de unidades de producto, diseñadas y entrenadas mediante algoritmos de optimización híbrida, todo esto motivado a que en la industria de alimentos, es de interés observar en tiempo real la gráfica del comportamiento de calidad de todas las respuesta del proceso a la vez, en función de cada factor; y que permita crear el sistema de control estadístico de calidad en tiempo real; con el fin de contribuir en el aporte de estos conocimientos (SAS JMP, 2014).

Por su parte se empleó Matlab con sus cajas de herramientas (“toolboxes”), para el diseño del controlador difuso. Se utilizó Simulink de Matlab, para realizar las simulaciones respectivas del control difuso.

PROCEDIMIENTO

Se describe por fases en función de los objetivos específicos del trabajo, dando respuesta a las interrogantes: actividad, técnicas/instrumentos, y resultados parciales esperados (Mendoza, 2015). En el orden de la idea anterior la investigación se desarrolló mediante las fases:

Fase I: caracterización de la infraestructura tecnológica del sistema de producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. Durante esta fase se realizó una revisión bibliográfica extensa sobre los equipos utilizados en el control de cultivos de levaduras, específicamente biorreactores y sus dispositivos auxiliares (agitación, pH, entre otros); así como lo relacionado con el estado del arte correspondiente al modelado, simulación y control automático de bioprocesos, empleando para ello la técnica de la revisión documental y un instrumento propio de la misma como lo es la matriz de registro, herramienta que permite asentar de manera organizada y selectiva datos o información que ya ha sido recogida mediante otros instrumentos, ya sea por el mismo investigador o por otros investigadores (Hurtado, 2012).

Fase II: experimentación para la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. Esta fase de la investigación se inició con el diseño del experimento que se refiere al plan, estructura o estrategia para el estudio preciso de un evento, siempre que cumpla con dos condiciones básicas: manipulación y aleatorización (Kerlinger y Howard, 2002). En este propósito, el diseño centró su atención en el estudio de cómo varían las condiciones habituales de ejecución del proceso de producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii* para aumentar la probabilidad de detectar cambios significativos en las respuestas, a fin de obtener un mayor conocimiento del comportamiento del proceso. En ese mismo sentido, se empleó un diseño de arreglo de tratamientos Hipercubo Latino Optimal Escalable, el cual permitió llevar a cabo el complejo proceso de producción del microorganismo, que requiere de una experimentación

en laboratorio, con un montaje instrumental y unas medidas de las respuestas que se hacen difíciles y costosas de realizar, justificando de esta forma el uso de este tipo de diseño de muestreo que resulta económico, pero robusto (Ávila, 2018).

En relación con este último, se estableció un total de 14 tratamientos, con tres factores experimentales (variables dependientes), X_1 : Concentración de sustrato con un rango aproximado de 10 – 25 %, X_2 : Temperatura en un intervalo entre 35 - 40 °C y X_3 : Velocidad de agitación en un nivel comprendido entre 100 – 400 rpm a fin de observar su nivel de influencia en seis respuestas fundamentales como lo son Y_1 : Cantidad de Biomasa medida en ufc/ml, Y_2 : pH en iones de hidrógeno, Y_3 : Sólidos solubles totales en ° Brix, Y_4 : potencial oxido reducción en mV, Y_5 : Tiempo de latencia expresado en horas Y_6 : Tiempo en que alcanzó la máxima cantidad de biomasa.

Hechas las consideraciones anteriores, se procedió a ubicar los materiales y equipos necesarios para el proceso de producción del microorganismo. Con referencia al material biológico, la levadura del género *Saccharomyces boulardii*, fue adquirida en una conocida red farmacéutica a nivel nacional, su nombre es Florestor fabricada por laboratorios Merck, pertenece a los cultivos liofilizados en presentación de 6 y 12 sobres de 1,5 gramos/sobre. El material vegetal, lactosuero es proveniente de la producción de queso llanero de la UPS José Laurencio Silva, ubicada en el Estado Cojedes, quien cuenta con un rebaño de ganado mestizo. Este suero tipo dulce fue obtenido por vía enzimática, agregando cuajo, sin acidificación. El mismo fue trasladado al Laboratorio de Ingeniería y Tecnología de los Alimentos (LITA) de la UNELLEZ- SAN CARLOS, donde se caracterizó física y químicamente empleando para ello las normas COVENIN 370:1997 y COVENIN 658-1997.

Por su parte, reactivos y aditivos se acondicionaron de acuerdo a las concentraciones de sustrato para cada corrida y se agregaron en el recipiente del biorreactor para la producción de biomasa, donde se proporcionaron las condiciones óptimas de crecimiento del

microorganismo. Para ello se utilizaron las técnicas del laboratorio de microbiología de la UNELLEZ – SAN CARLOS, y lo establecido en las normas COVENIN 1337-90. Asimismo, se procedió a preparar los medios de cultivo necesarios para la siembra en placas de la levadura en estudio *Saccharomyces boulardii* siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo 1 (preparación de agar, agua peptonada, sustrato, inóculo y proceso de fermentación). Una vez iniciado y estabilizado el proceso se midieron los sólidos solubles totales (° Brix) de inicio y se procedió a la toma de las muestras, las cuales se realizaron en intervalos de tiempo de 1 hora, desde la hora de inicio (h_0) hasta la hora final (h_{12}). Esta toma de muestra consistió en extraer 20 ml del sustrato lactosuero inoculado con una pipeta estéril y agregarlo en un frasco con 180 ml de agua peptonada y de esta manera se obtuvo la dilución 10^{-1} . Posteriormente se preparó la dilución 10^{-3} , tomando 1 ml de la dilución anterior para añadirlo en un frasco con 90 ml de agua peptonada previamente preparada y esterilizada. De igual manera se continuaron preparando las diluciones 10^{-5} , 10^{-7} .

Después de preparar todas las diluciones por triplicado se comenzó con la siembra en placas de Petri; la misma se realizó en superficie y consistió en agregar 0.1 ml de la dilución correspondiente y con una varilla angular de vidrio estéril, se distribuyó uniformemente el inóculo sobre la superficie del agar. La siembra se realizó en el siguiente orden: 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} , 10^{-1} y por triplicado y finalmente se incubaron las placas en una estufa a 30° C por 5 días, a fin de realizar el recuento del microorganismo (ufc) con la ayuda de un contador de colonia digital (ver Anexo 1). Al mismo tiempo se procedió a realizar las mediciones de las variables respuesta descritas en el arreglo de tratamiento (Tabla 9) para cada hora hasta obtener evidencia del máximo crecimiento (fase exponencial del crecimiento microbiano). Este procedimiento se repitió para cada tratamiento hasta completar los 14; además se empleó como técnica para la recolección de la información la observación directa, debido a que proporcionó los criterios para que el investigador pudiera captar exactamente aquello que le interesó del evento, así como los códigos, categorías y valoraciones para registrar y dar una estimación del mismo (Hurtado, 2012).

Después de las consideraciones anteriores, la información obtenida a través de esta fase se convirtió en el insumo apropiado para la determinación de los parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento, rendimiento de biomasa, tiempo de duplicación, productividad, entre otros) del tratamiento más eficiente y efectivo. Estos sirvieron de base para la creación del modelo dinámico de producción semicontinua de levadura del género *Saccharomyces boulardii*, empleando para lo descrito por Soares (1997) y Crespo (2010).

Fase III: establecimiento del modelo no lineal para la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. En esta etapa de la investigación se creó el modelo ajustado al proceso experimental (metamodelo) el cual requirió hacerle mantenimiento en el tiempo, para ajustar las covarianzas y ruidos nuevos, como son los cambios en la materia prima, entre otros. Para ello se empleó el programa SAS JMP 8 (2014), teniendo como insumo el resultado de la fase anterior (matriz de diseño de tratamientos, repeticiones y, las respectivas respuestas tecnológicas medidas, para cada tratamiento), seguidamente se realizó un análisis preliminar de bondad de ajuste de los datos, en la búsqueda de diagnosticar qué términos del modelo de alto orden fueron los más importantes en explicar cada respuesta con ayuda del módulo de regresión de superficie de respuesta, y para la optimización operativa el módulo de perfiles de respuesta y de deseabilidad, junto con el simulador del programa SAS JMP 8, con la finalidad de obtener un modelo para la producción de biomasa. En esta fase se usó como técnicas de recolección de la información el modelado y la simulación, por presentarse como herramientas útiles en el modelaje de sistemas naturales en áreas como la física, química y biología, permitiendo reproducir un evento o situación, mediante un modelo con la modificación arbitraria de las variable que lo conforman y observar las consecuencias de sus modificaciones (Bisquerra, 2000).

Fase IV: diseño de un controlador difuso que mejore la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. Durante esta etapa se establecieron el conjunto de reglas lingüísticas del control difuso, creadas en base al juicio de expertos y

tomando en consideración la información sobre los esquemas genéricos del razonamiento, que permitieron combinar varias reglas para decidir las salidas finales del sistema (Wang 1994; Driankov y otros, 1996; Passino y Yurkovich, 1998). En ese mismo sentido se utilizó como herramienta para la recolección de la información la simulación por computadora con Matlab para lógica difusa, “Fuzzy Logic Tool Box” (The Math Works Inc., 2008-a).

Fase V: caracterización de la contribución de la lógica difusa en la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. En esta fase de la investigación se determinó la eficiencia de la acción de control expresada por un cociente entre los términos cuantitativos inherentes a los insumos utilizados y a los productos obtenidos en un periodo de tiempo determinado; asimismo se analizó la eficacia la de producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, teniendo en cuenta el grado en que se realizan las actividades planificadas y se alcanzan los resultados planificados. Además se examinó la efectividad con base en la trascendencia de los objetivos planteados.

Fase VI: Documentación y presentación de resultados. Una vez completada las fases anteriores, se redactaron las conclusiones y observaciones, se completó el informe sobre la investigación para su posterior defensa pública.

“Para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea”
Alexander Fleming

RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

Este apartado exhibe el desarrollo del esquema metodológico propuesto en el capítulo anterior, empleando para ello los principios científicos de forma sistemática, a fin de determinar la contribución de la lógica difusa en la producción eficiente, eficaz y efectiva de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. En este propósito en primer lugar se expone la caracterización de la infraestructura tecnológica del sistema de producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. Seguidamente, se muestra proceso de experimentación para la producción semicontinua de levaduras. Posteriormente se establece el modelo no lineal para la producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. Luego se presenta el diseño del controlador difuso que mejora la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. Asimismo, se muestra la caracterización de la contribución de la lógica difusa y finalmente se hace un análisis de los resultados obtenidos.

Caracterización de la infraestructura tecnológica del sistema de producción de levaduras

En el propósito de caracterizar la infraestructura tecnológica para el sistema de producción de levaduras se ubicaron en primer lugar los equipos auxiliares para el biorreactor, como sistemas de aireación, temperatura, además de los sensores de pH, POR, sólidos solubles totales, entre otros, con los que se cuantificaron las variables que facilitaron el control del proceso y permitieron la obtención de modelos lo más exactos posibles capaces de describir el crecimiento de las células y la formación de productos.

En relación con este último y considerando la naturaleza no lineal del bioproceso se procedió a registrar de manera organizada y selectiva la información al respecto (Tabla 10), empleando para ello los criterios de pertinencia, exhaustividad y actualidad de tal forma que los documentos consultados lograron reflejar los avances y hallazgos de la ciencia necesarios y suficientes para fundamentar el presente objetivo de la investigación.

Tabla 10. Publicaciones relevantes para el tema de estudio

Autor	Título de la investigación	Año	Aspectos relevantes
Ávila, E.	Avances en diseños de tratamientos de relleno del espacio experimental, de utilidad en modelación y simulación de sistemas complejos.	2018	Métodos Minimax-Maximin DOE y Métodos adaptativos
Márquez, M.; Ramos, L.; Balderrama, B.	Stable fuzzy control and observer via LMIs in a fermentation process	2018	Diseño de un control difuso y una observación difusa, donde los consecuentes de las reglas difusas son submodelos lineales de un proceso de fermentación en una representación de espacio de estado.
Malfertheiner, P.; Megraud, F.; O'Morain, C.; Gisbert, J.; Kuipers, E.; Axon, Bazzoli, A.; Gasbarrini, A.; Atherton, J.; Graham, D.; Hunt, R.; Moayyedi, P.; Rokkas, T.; Rugge, M.; Selgrad, M.; Suerbaum, S.; Sugano, El-Omar, K.	Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report	2017	Efectividad de la cepa probiótica de <i>Saccharomyces boulardii</i> en la erradicación de <i>H. pylori</i> .
Calderón, J.	Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en la fermentación de un sustrato complejo	2017	Modelos cinéticos no estructurados del crecimiento microbiano
Rojas, Y.; Noda, L.; Crespo, Ll.	Efecto de los Sustratos Mango (<i>Mangifera indica</i>), Inulina (<i>Inula helenium</i>) y Lechada de maíz (<i>Zea mays</i> var. <i>saccharata</i>) en la Producción Eficiente de <i>Saccharomyces boulardii</i> .	2017	Concentración óptima para diferentes sustratos, tipos de cultivo para la <i>Saccharomyces boulardii</i>

Continuación Tabla 10. Publicaciones relevantes para el tema de estudio

Autor	Título de la investigación	Año	Aspectos relevantes
Pérez, J.; Ramírez, R.; Cravo G.; Crespo LL.	Evaluación del crecimiento de <i>Saccharomyces boulardii</i> utilizando como sustrato inulina extraída a partir de la cebolla (<i>allium cepa</i>)	2016	Importancia de los cultivos semicontinuos, tasa de crecimiento y velocidad de reacción para un sustrato no convencional
Márquez, M.; García, A.; Ramos, J.; Márquez, C.; Baños, U.	Control predictivo usando un modelo difuso para la tasa de crecimiento bacteriano	2014	Aplicabilidad de la lógica difusa en el control de la tasa de crecimiento bacteriana de microorganismos para procesar fenol.
Arredondo, T.	Introducción a la lógica difusa	2014	Operación es con conjuntos difusos, sistema de inferencia
Márquez, M.; Muñoz, F.; García, A.	Lógica Difusa Aplicada al Control de Seguimiento en un Reactor Biológico	2013	Conjuntos difusos en el control de la biodegradación de fenol en un reactor
Ávila, E.	TEORÍA PRFD-HIVD6 Co-Optimización Estadística de Criterios en Calidad	2012	Estudio de la función de deseabilidad o función conveniencia como uno de los métodos más utilizados en la industria para la optimización de los parámetros de calidad de un proceso
Rivera, M.; Suarez, D.	Diseño y Construcción de un Biorreactor Batch Aerobio para Cultivo de Bacterias Biodegradadoras de Petróleo	2010	Función operativa y la biológica, modo de cultivo
Escalada, M.	Biorreactores	2010	Disposición de los equipos auxiliares de un biorreactor y modelo de cultivos
Victores, S.; Castillo, A.; Faife, E.; Rabasa, Y.; Rodríguez, Y.; Rojas, L.; Palacios, J.; Figueredo, A.	Cultivos Semicontinuos como una Herramienta para la Caracterización Celular del Hibridoma murino 1E10.	2008	Aplicabilidad y ventajas de los cultivos semicontinuos para el desarrollo de microorganismos

Continuación Tabla 10. Publicaciones relevantes para el tema de estudio

Autor	Título de la investigación	Año	Aspectos relevantes
Durango, L.	Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo <i>Saccharomyces spp.</i> a nivel de laboratorio	2007	Efecto del pH y la agitación en la concentración de biomasa
Tormo, R.	Probióticos. Concepto y mecanismos de acción	2006	Temperatura optima e desarrollo de <i>Saccharomyces boulardii</i> y efecto que ejerce sobre los microorganismo patógenos

Asimismo, se consultaron otros documentos que permitieron aportar enfoques, conceptos y/o experiencias significativas para fundamentar la investigación.

Experimentación para la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

En el propósito de iniciar la fase de experimentación se procedió a la caracterización del sustrato (lactosuero) con la finalidad de que pueda ser acondicionado y garantice la producción de biomasa de *Saccharomyces boulardii*.

En la Tabla 11 se muestran las principales características del suero fresco sin fermentar, entre ellas se aprecia que el valor promedio de los sólidos solubles totales (6,65 °Brix) es muy similar a los obtenidos por Guerrero y otros (2010) y Escobar y otros (2010) indicando la presencia de los azúcares de la leche.

Con referencia al valor de pH (6,35) es ligeramente menor (1,86 %) al reportado por Londoño y otros (2008) y ligeramente mayor al mostrado por Linden y Lorient (1996)

(3,94 %) y al compararlo con la clasificación realizada por Parra (2009), se demuestra que se encuentra dentro del rango establecido para lactosuero de tipo dulce, debido se ubica en el intervalo de 5,6 a 6,5.

Con respecto a la proteína (0,92 %) mostró un valor muy similar al descrito por Linares y otros (2015) (0,6 % - 1 %), Miranda y otros (2007) (0,93%) y Londoño y otros (2008) (0,95%), demostrando con ello que es una fuente nutritiva rica en aminoácidos esenciales (Ha y Zemel, 2003; Ibrahim y otros, 2005), que al ser utilizada como sustrato favorece el crecimiento de la levadura del género *Saccharomyces boulardii*.

Por su parte, el valor de la densidad (1,03 g/ml) es ligeramente superior (1,025 g/ml) al reportado por Miranda y otros (2009) y Linden y Lorient (1996), aunque se encuentra entre los rangos permitidos para sueros de tipo dulce y su variación puede deberse a finos solidos que pasan de la masa de cuajada al suero al momento del desuere, producto del trabajo mecánico fuerte que se le proporciona a la cuajada durante la agitación en la tina quesera, o a temperaturas bajas de coagulación de la leche por debajo de 32 °C (Veisseyre y otros, 1980).

Tabla 11. Caracterización física y química del lactosuero

Parámetros	Máximo	Mínimo	media	Desv. típ.
SST (°Brix)	6,69	6,60	6,65	±0,04726
pH	6,38	6,32	6,35	±0,03000
Densidad (g/ml)	1,03	1,03	1,03	±0,00058
Proteína %	0,96	0,89	0,92	±0,03606
Acidez (g ácido láctico/ l suero)	1,10	1,09	1,09	±0,00577

N=Numero de repeticiones (3)

En la Tabla 12, se observa la matriz “D” de diseño de muestreo utilizada para la recolección de la información y modelación del proceso de producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii* en forma eficiente y eficaz. Asimismo, el arreglo está formado por dos repeticiones para cada tratamiento, a fin de detectar los efectos asociados o cambios significativos en las respectivas respuestas tecnológicas medidas.

En relación con este último, la respuesta potencial redox es uno de los factores más importantes en el control del crecimiento y desarrollo de los microorganismos, debido a que influye en su metabolismo e indica las relaciones de oxígeno de los microorganismos vivos. Asimismo, puede ser utilizado para especificar el ambiente en que los microorganismos son capaces de generar energía y sintetizar nuevas células sin recurrir al oxígeno molecular. En ese mismo sentido, se puede observar que para la investigación tuvo un valor mínimo de 88,1 y un máximo de 99,9 mV, lo que indica que el metabolismo del microorganismo está funcionando a una velocidad de moderada a alta, en consecuencia existe presencia de crecimiento microbiano y el microorganismo esta degradando las moléculas de alimento (sustrato) para obtener energía a fin de utilizarla para sintetizar ATP e impulsar por el movimiento de electrones a través de la cadena de transporte de electrones, una serie de proteínas incrustadas en la membrana interna de la mitocondria.

Tabla 12. Matriz de diseño de tratamientos y respuestas tecnológicas medidas Biomasa, pH, SST, Potencial óxido Reducción (POR), Tiempo de latencia y Tiempo de máx. ufc (máxima biomasa): Diseño Hipercubo Latino

N° Trat.	Factores Experimentales			Respuestas					
	Concen. de sustrato	Temp.	Vel. de Agitación	Cantidad de Biomasa	pH	Sólidos totales	POR	Tiempo de latencia	Tiempo máxima biomasa
	X ₁ (%)	X ₂ (° C)	X ₃ (rpm)	Y ₁ (log ₁₀ ufc/ml)	Y ₂ ([+])	Y ₃ (brix)	Y ₄ (mV)	Y ₅ (h)	Y ₆ (h)
1	23,85	38,46	308	10,41	4,79	17	88,8	1	10
2	13,46	38,85	100	10,83	4,73	9	91,6	2	5
3	14,62	35,38	285	10,83	4,62	9,5	88,1	1	9
4	12,31	37,31	377	10,73	4,68	6	95,4	1	8
5	20,38	36,92	400	10,06	4,73	14	90,1	1	7
6	18,08	40	192	10,30	4,73	11	99,9	1	5
7	15,77	39,62	354	10,85	4,75	10	98,8	1	9
8	11,15	36,54	169	10,83	4,70	6	90,2	1	6
9	16,92	37,69	262	10,49	4,75	11	91,1	1	7
10	19,23	35,77	123	10,41	4,70	10	90,5	1	9
11	25	36,15	215	10,53	4,79	19	97	1	7
12	10	39,23	238	10,52	4,81	6	98,4	1	8
13	21,54	38,08	146	10,21	4,79	18	90	1	6
14	22,69	35	331	10,32	4,74	18	92	1	8

Las figuras que se muestran a continuación describen el crecimiento microbiano para cada uno de los tratamientos detallados en la tabla 12, con lo que se logró establecer el tratamiento más eficiente y efectivo cuyos parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento, rendimiento de biomasa, tiempo de duplicación, productividad, entre otros) permitieron simular el modelo dinámico para la producción semicontinua de levadura del género *Saccharomyces boulardii* empleando las herramientas propias de la lógica difusa.

Por su parte, en la Figura 10, se observó que al comparar los tratamientos 2, 4, 8 y 12 en función a los parámetros máxima concentración de biomasa y tiempo máximo en alcanzar la misma, existe evidencia significativa de que el tratamiento 2 (13,46 % lactosuero enriquecido con fructosa), es el que presenta mayor cantidad de biomasa con un valor de 10,83 $\log_{10}$ Ufc/ml, la cual fue lograda en un tiempo de 5 h. Asimismo, se pudo apreciar que para dicho tratamiento, la fase de adaptación se ubicó entre la hora 0 y 2, luego pasa a la fase de crecimiento exponencial entre la hora 2 y 5 a fin de dar inicio a las actividades metabólicas captando enseguida los nutrientes presentes en el lactosuero, así como el oxígeno necesario para su reproducción, a su vez entre la hora 5 y 6 esta pasa a una fase estacionaria, en la hora 6 comenzó la fase de declive que se prolongó hasta la hora 12, en la misma el microorganismo consumió en su totalidad todos los nutrientes presentes en el proceso de reproducción de biomasa.

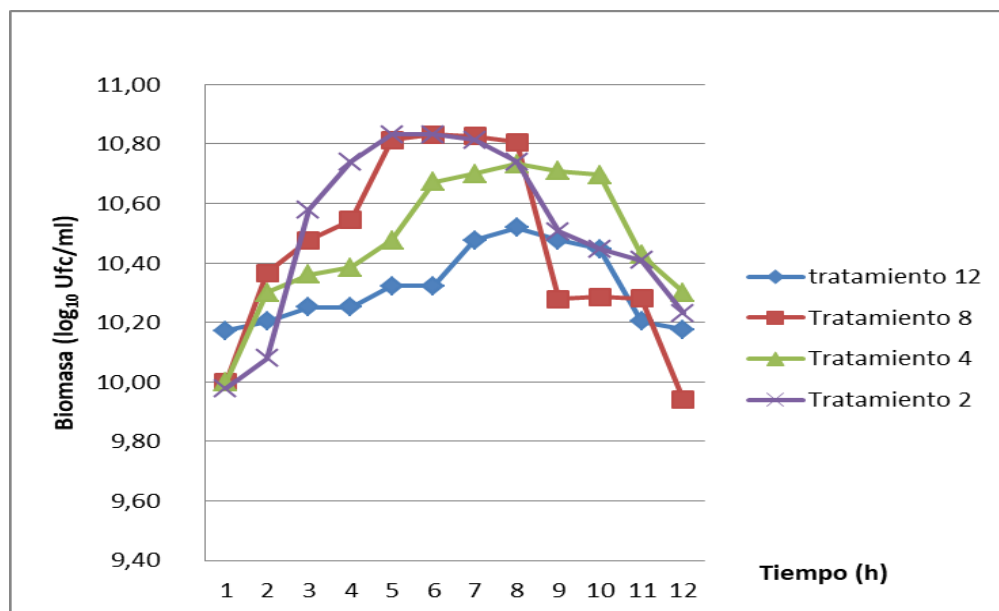


Figura 10. Concentración de Biomasa de *Saccharomyces boulardii* ($\log_{10}$ Ufc/ml) con lactosuero enriquecido vs. Tiempo (h) para los tratamientos 2, 4, 8 y 12.

De igual manera en la Figura 11, se observó al comparar los tratamientos 3, 6, 7 y 9 en función a los parámetros máxima concentración de biomasa y tiempo máximo en alcanzar la misma, existe evidencia significativa de que el tratamiento 7 (15,77 % lactosuero enriquecido con fructosa), es el que presenta mayor cantidad de biomasa con un valor de $10,85 \log_{10} \text{Ufc/ml}$, logrado en un tiempo de 9 h. Asimismo, fue posible apreciar que el tratamiento 3 (14,62 % lactosuero enriquecido con fructosa) también mostró una buena producción de biomasa con $10,83 \log_{10} \text{Ufc/ml}$ obtenido en el mismo tiempo, lo que permite inferir que para concentraciones en intervalos comprendidos entre [14,62 15,77] el crecimiento microbiano es muy similar.

Adicionalmente, se pudo apreciar que para el tratamiento 7, la fase de adaptación se ubicó entre la hora 0 y 1, para dar paso a la fase de crecimiento exponencial, concentrada entre la hora 2 y 5 a fin de dar inicio a las actividades metabólicas captando enseguida los nutrientes presentes en el lactosuero, así como el oxígeno necesario para su reproducción, a su vez entre la hora 9 y 10 esta la fase estacionaria, donde se presenció ausencia del crecimiento por agotamiento de nutrientes y acumulación de sustancias tóxicas. Posteriormente, en la hora 10 comenzó la fase de declive que se prolongó hasta la hora 12, en la misma el microorganismo consumió en su totalidad todos los nutrientes presentes en el proceso de reproducción de biomasa.

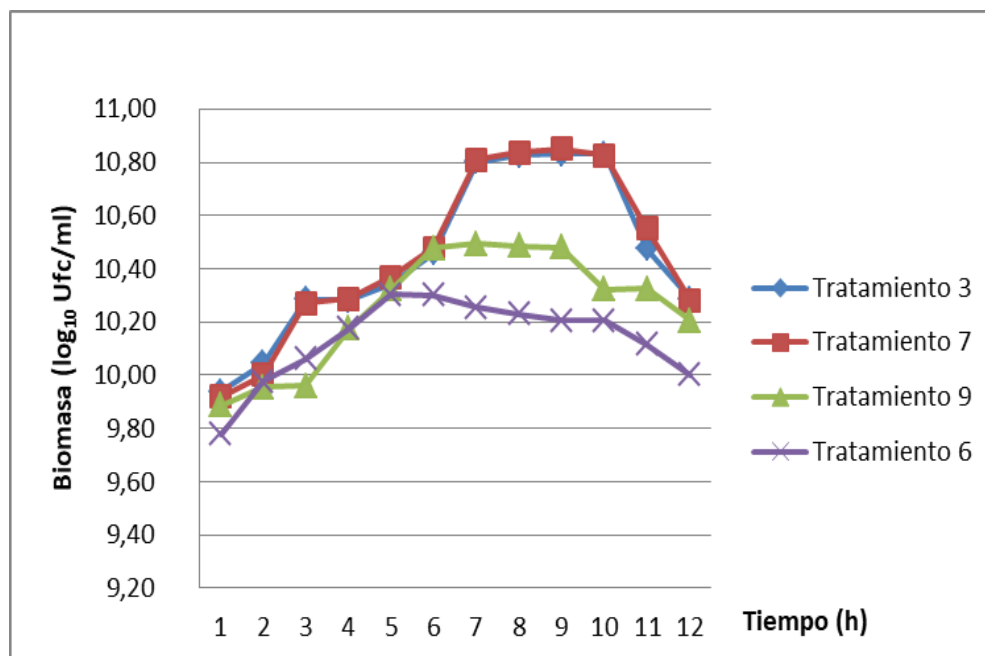


Figura 11. Concentración de Biomasa de *Saccharomyces boulardii* (log₁₀Ufc/ml) con lactosuero enriquecido vs. Tiempo (h) para los tratamientos 3, 6, 7 y 9.

Asimismo, en la Figura 12, se muestra que al comparar los tratamientos 1, 5, 10, 11, 13 y 14 en función a los parámetros máxima concentración de biomasa y tiempo máximo en alcanzar la misma, el tratamiento 11 (25 % lactosuero enriquecido con fructosa), es el que presenta mayor producción de biomasa con un valor aproximado de 10,53 log₁₀Ufc/ml, logrado en un tiempo de 7 h. Además, se observa con certeza que para dicho tratamiento, la fase de adaptación se ubicó entre la hora 0 y 1, para luego pasar a la fase de crecimiento exponencial entre la hora 1 y 7 a fin de dar inicio a las actividades metabólicas captando enseguida los nutrientes presentes en el lactosuero, así como el oxígeno necesario para su reproducción, a su vez entre la hora 7 y 8 esta pasa a una fase estacionaria, en la hora 8 se inició la fase de declive que se prolongó hasta la hora 12, en la misma el microorganismo

consumió en su totalidad todos los nutrientes presentes en el proceso de reproducción de biomasa.

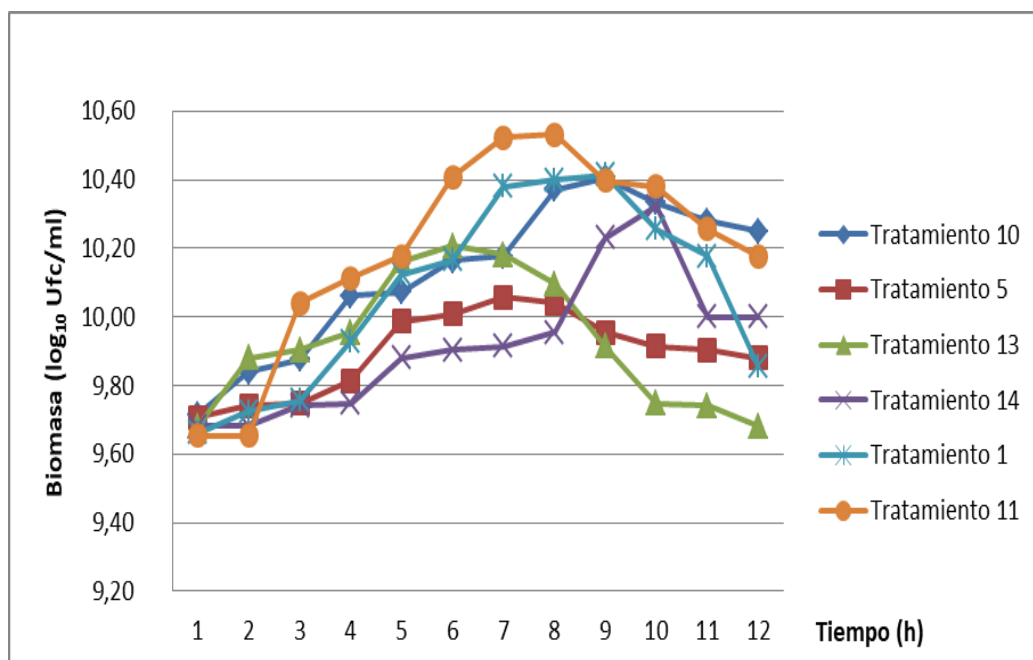


Figura 12. Concentración de Biomasa de *Saccharomyces boulardii* ($\log_{10}$ Ufc/ml) con lactosuero enriquecido vs. Tiempo (h) para los tratamientos 1, 5, 10, 11, 13 y 14.

En líneas generales el comportamiento de la biomasa evidenció que el lactosuero enriquecido con fructosa, puede ser considerado un medio apropiado para la producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, debido a que mostró altas concentraciones ($6,80 \times 10^{10}$ Ufc/ml) $10,83 \log_{10}$ Ufc/ml en un tiempo máximo de 5 horas (Tratamiento 2) comparadas con la obtenida por Pardo y otros (2009), con cepas de la misma naturaleza y medios de cultivo comerciales.

De la misma manera, al compararla con la obtenida en investigaciones previas realizadas por la autora (Rojas y otros, 2017), utilizando sustratos no convencionales como mango (*Mangífera indica*) ($3,24 \times 10^7$ Ufc/ml), inulina (*Inula helenium*) ($1,18 \times 10^8$

Ufc/ml) y lechada de maíz (*Zea mays var. saccharata*) ($1,23 \times 10^9$ Ufc/ml), se demuestra que el lactosuero enriquecido suple los requerimientos nutricionales del microorganismo, representando una alternativa como medio de cultivo, que proporciona ventajas en cuanto costos y composición nutricional, por ser un sustrato rico en proteínas, minerales, aminoácidos esenciales y azúcares como la lactosa, permitiendo de esta forma que se tan eficiente como un medio comercial.

Hechas las observaciones anteriores, en las tablas 13 y 14, se muestran los parámetros cinéticos que permiten emular el proceso de producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, para el tratamiento 2 que ha demostrado ser el más eficiente al lograr una mayor producción de biomasa con una mínima cantidad de sustrato en el menor tiempo posible.

Tabla 13. Valores de velocidad específica de crecimiento, Rendimiento en biomasa, Tiempo de generación y Productividad

Parámetro	Unidad	Valor
$\mu = \frac{\ln(\frac{UFC\ final}{UFC\ inicial})}{(t_2 - t_1)}$	h^{-1}	0,3936
$Y = \frac{\Delta x}{\Delta s}$	g/ml	0,57
$td = \frac{\ln(2)}{\mu}$	H	1,76
P	$\log_{10}$ Ufc/ml	2,17

Tabla 14. Parámetros Cinéticos del Proceso

Parámetro	identificación	valor	Unidades
velocidad específica máxima de consumo de fructosa	q _{smax}	3,47	g fructosa/(g biomasa.h)
velocidad específica máxima de consumo de oxígeno	q _{omax}	0,252	g oxígeno/(g biomasa.h)
velocidad específica máxima de crecimiento oxidativo en etanol	μ _{oemax}	0,15	h ⁻¹
parámetro de saturación del consumo de etanol por efecto de fructosa	K _e	0,09	g/l
parámetro de inhibición del consumo de etanol por efecto de fructosa	K _i	0,09	g/l
parámetro de saturación de fructosa	K _s	0,18	g/l
parámetro de saturación de oxígeno	K _o	0,0001	g/l
coeficiente estequiométrico asociado al oxígeno en el crecimiento oxidativo en glucosa	a	0,4137	g oxígeno/g glucosa

Establecimiento del modelo no lineal para la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

Para el modelo se utilizó el análisis de regresión lineal multidimensional Screening para cada respuesta, con el módulo Screening del software SAS JMP 8, aplicando análisis de mínimos cuadrados ordinarios matricial estándar (m.c.o.m.), creando y ortogonalizando la matriz “X” de diseño poblacional con regresión Ridge, en la búsqueda de determinar cuáles términos del modelo lineal aditivo de alto orden son los más importantes en explicar cada respuesta. Finalizando con la modelación definitiva y optimización operativa del proceso.

En lo siguiente, se muestra, una visualización de la bondad de ajuste de los datos a modelos lineales aditivos cuadráticos, del tipo:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i \neq j}^j \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon \quad (9)$$

En ese mismo sentido, el modelo para 03 (tres) factores experimentales, tendrá la siguiente estructura (diez coeficientes regresores y un término independiente β_0):

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \varepsilon_i \quad (10)$$

Una vez ajustado los modelos (uno para cada respuesta), se comprobó sus supuestos básicos de los errores de predicción: $\varepsilon_i \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

1. Normalidad: los datos obtenidos en cada nivel del factor se ajustaron razonablemente a una distribución Normal de Gauss.
2. Homocedasticidad: la variabilidad de los datos en cada nivel del factor es similar (contraste de igualdad de varianzas)
3. Linealidad: los residuos (diferencia de los datos a su media, en cada nivel del factor) se distribuyen alrededor del cero (gráfico de residuos).
4. Independencia: las observaciones se realizan de forma independiente unas de otras

Asimismo se comprobaron los supuestos básicos, se realizó un análisis screening para modelación lineal aditiva de alto orden, que utiliza regresión de máxima verosimilitud, que agrega términos de interacciones de alto orden posibles al modelo.

En las figuras 13, 14, 15 y 16, siguientes se visualizan los términos importantes en el modelo (términos resaltados en franja oscura).

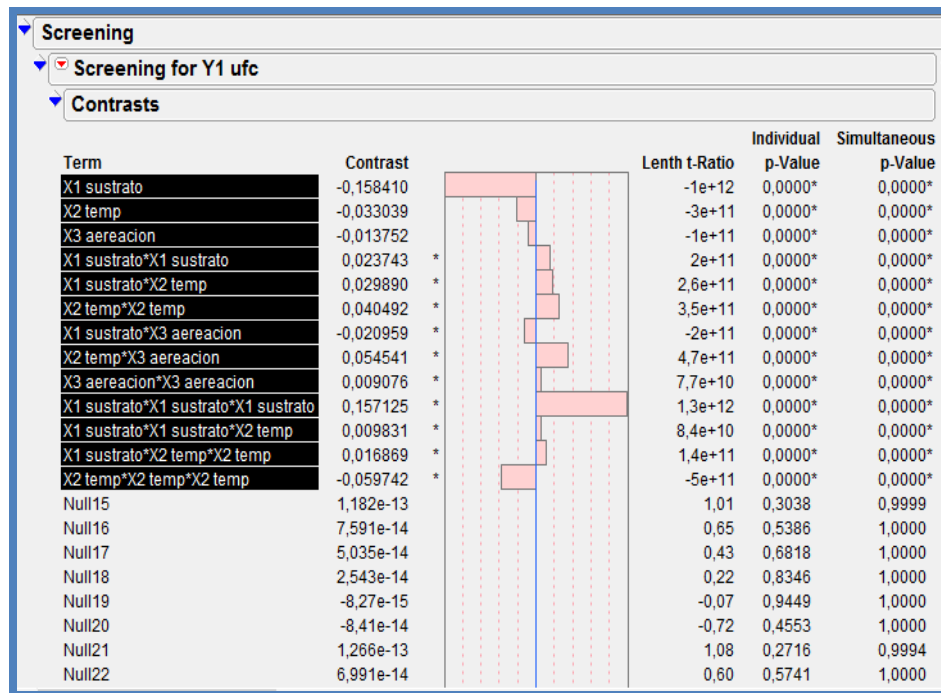


Figura 13. Contraste para la respuesta Y₁: Concentración de biomasa

En la Figura 13, se observa el análisis screening para la variable concentración de biomasa (Ufc/ml), indicando que todos los términos son capaces de explicar la variabilidad de la respuesta cantidad de biomasa debido a su nivel de significancia, por lo que el modelo suficiente para la variable respuesta Y₁ (concentración de biomasa), contiene la siguiente estructura:

$$Y_1 = f(X_1, X_2, X_3, X_1^2, X_1X_2, X_2^2, X_1X_3, X_2X_3, X_3^2, X_1^3, X_1^2X_2, X_1X_2^2, X_2^3) \quad (13)$$

En la Figura 14, que se muestra a continuación para la variable sólidos solubles totales (°Brix), se observa que todos los términos son capaces de explicar la variabilidad de

la respuesta debido a su nivel de significancia, por lo que el modelo suficiente para la variable respuesta Y_3 (sólidos solubles totales), contiene la siguiente estructura:

$$Y_3 = f(X_1, X_2, X_3, X_1^2, X_1X_2, X_2^2, X_1X_3, X_2X_3, X_3^2, X_1^3, X_1^2X_2, X_1X_2^2, X_2^3, \text{Null}) \quad (11)$$

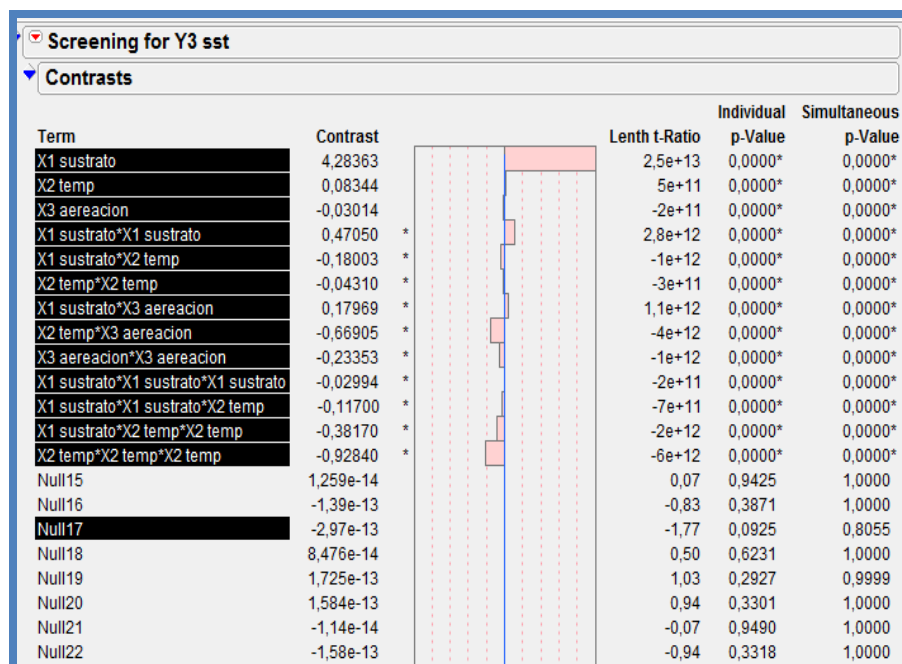


Figura 14. Contraste para la respuesta Y_3 : Sólidos solubles totales

En la Figura 15, que se muestra a continuación para el caso de POR (mV), todos los términos del modelo son necesarios para explicar la variabilidad de la respuesta, es decir que los mismos son altamente significativos (nivel de probabilidad), por lo que contiene la siguiente estructura:

$$Y_4 = f(X_2, X_3, X_1, X_2^2, X_2X_3, X_3^2, X_2X_1, X_3X_1, X_1^2, X_2^3, X_2^2X_3, X_2X_3^2, X_3^3) \quad (12)$$

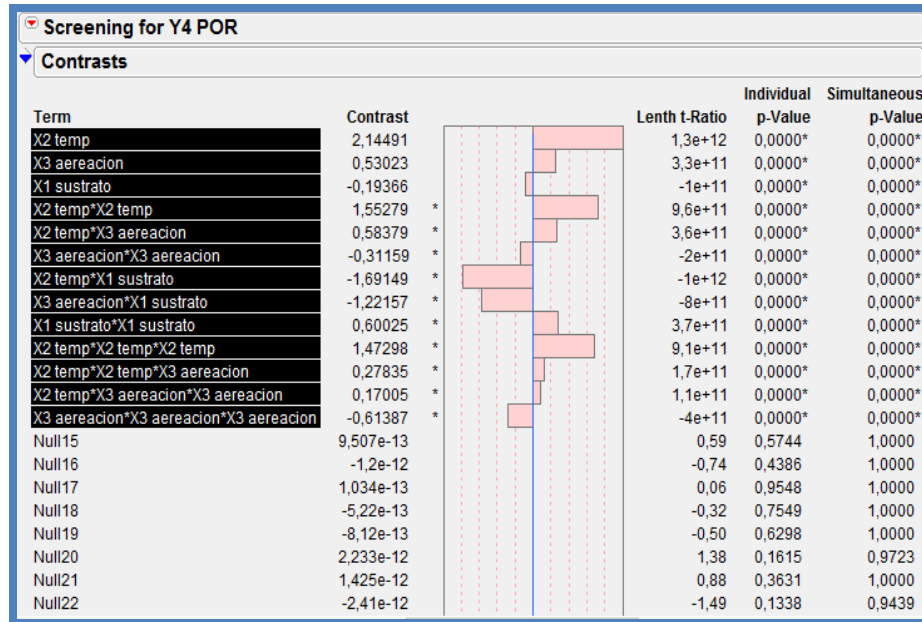


Figura 15. Contraste para la respuesta Y₄: Potencial Oxido Reducción

En las figuras 16 y 17, que se muestran a continuación, para las variables tiempo de latencia (horas) y tiempo de máxima biomasa (horas), todos los términos del modelo son necesarios para explicar la variabilidad de las respuestas; es decir, que los mismos son altamente significativos (nivel de probabilidad), por lo que contiene la siguiente estructura:

$$Y_5 = f(X_3, X_1, X_2, X_3^2, X_3X_1, X_1^2, X_3X_2, X_1X_2, X_2^2, X_3^3, X_3^2X_1, X_3X_1^2, X_1^3) \quad (13)$$

Asimismo, para la variable tiempo de latencia se cumple que el modelo esté conformado por los siguientes términos:

$$Y_5 = f(X_3, X_1, X_2, X_3^2, X_3X_2, X_2^2, X_3X_1, X_2X_1, X_1^2, X_3^3, X_3^2X_2, X_3X_2^2, X_2^3) \quad (14)$$

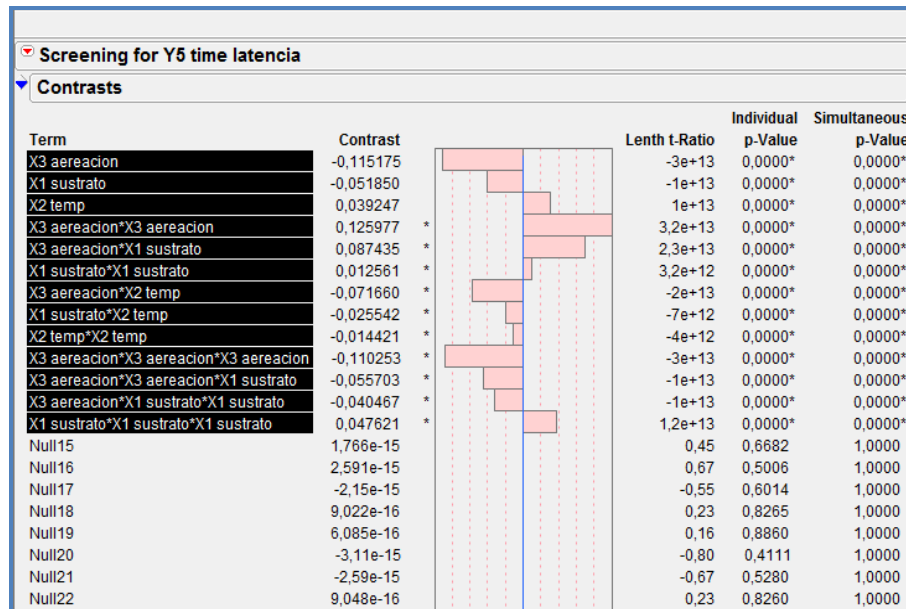


Figura 16. Contraste para la respuesta Y₅: Tiempo de latencia

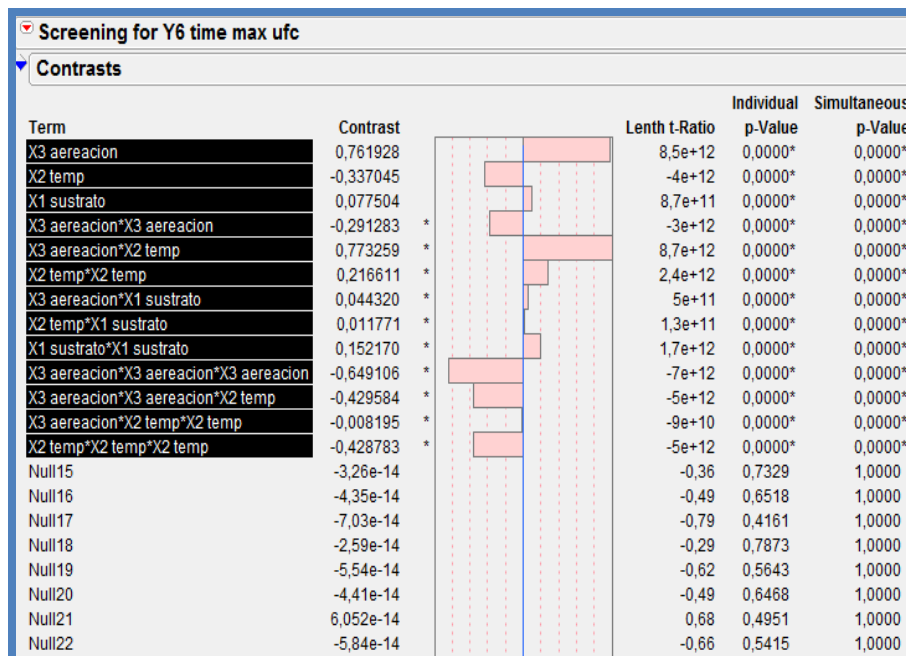


Figura 17. Contraste para la respuesta Y₆: Tiempo de máxima biomasa

Sobre la base de las consideraciones anteriores (análisis screening), se ajustó el conjunto de modelos (metamodelo) que emulan el proceso de producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, tomando cada modelo (ecuación) de los resultados anteriores, en las figuras 18, 19, 20, 21 y 22, siguientes se muestran los modelos y su significancia estadística para cada término modelos que se utilizó para el proceso de optimización vía simulación, bajo las restricciones de calidad de las respuestas establecidas, es decir se resuelve iterativamente e interactivamente el conjunto de modelos en forma simultánea, bajo las siguientes condiciones: maximizar la cantidad de biomasa, minimizar los sólidos totales (Brix), Target (indica “valor especificado es mejor”) Potencial Oxido Reducción (POR), minimizar el tiempo de latencia y minimizar el tiempo de máxima biomasa.

Response Y1 ufc				
Parameter Estimates				
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	10,382355	0,016549	627,38	<,0001*
X1 sustrato(10,25)	-1,08217	0,040354	-26,82	<,0001*
X2 temp(35,40)	0,5245937	0,062961	8,33	<,0001*
X3 aereacion(100,400)	-0,395927	0,068882	-5,75	<,0001*
X1 sustrato*X1 sustrato	0,0779663	0,01938	4,02	0,0011*
X1 sustrato*X2 temp	0,0935011	0,017116	5,46	<,0001*
X1 sustrato*X3 aereacion	0,0673133	0,016305	4,13	0,0009*
X2 temp*X2 temp	0,2629526	0,023841	11,03	<,0001*
X2 temp*X3 aereacion	0,3113829	0,021245	14,66	<,0001*
X3 aereacion*X3 aereacion	0,0726128	0,01696	4,28	0,0007*
X1 sustrato*X1 sustrato*X1 sustrato	1,1757086	0,054938	21,40	<,0001*
X2 temp*X2 temp*X2 temp	-0,814725	0,091787	-8,88	<,0001*
X3 aereacion*X3 aereacion*X3 aereacion	0,5104448	0,09639	5,30	<,0001*

Figura 18. Modelo para la respuesta Y₁: Concentración de biomasa

▼ **Response Y3 sst**

▼ **Parameter Estimates**

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	10,908911	0,022976	474,79	<,0001*
X1 sustrato(10,25)	-0,487102	0,056029	-8,69	<,0001*
X2 temp(35,40)	14,451172	0,087416	165,31	<,0001*
X3 aereacion(100,400)	-14,11853	0,095637	-147,6	<,0001*
X1 sustrato*X1 sustrato	-0,804416	0,026907	-29,90	<,0001*
X1 sustrato*X2 temp	-0,013553	0,023765	-0,57	0,5769
X1 sustrato*X3 aereacion	0,850325	0,022638	37,56	<,0001*
X2 temp*X2 temp	2,8522107	0,033101	86,17	<,0001*
X2 temp*X3 aereacion	1,4246336	0,029497	48,30	<,0001*
X3 aereacion*X3 aereacion	0,1934458	0,023547	8,22	<,0001*
X1 sustrato*X1 sustrato*X1 sustrato	10,061256	0,076277	131,90	<,0001*
X2 temp*X2 temp*X2 temp	-20,94886	0,127438	-164,4	<,0001*
X3 aereacion*X3 aereacion*X3 aereacion	19,70443	0,13383	147,24	<,0001*

Figura 19. Modelo para la respuesta Y₃: Sólidos totales

▼ **Response Y4 POR**

▼ **Lack Of Fit**

▼ **Parameter Estimates**

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	90,570097	0,579992	156,16	<,0001*
X1 sustrato(10,25)	-1,953261	1,414322	-1,38	0,1875
X2 temp(35,40)	-2,633008	2,206629	-1,19	0,2513
X3 aereacion(100,400)	1,0923891	2,41414	0,45	0,6574
X1 sustrato*X1 sustrato	2,16324	0,679222	3,18	0,0062*
X1 sustrato*X2 temp	-5,738727	0,599892	-9,57	<,0001*
X1 sustrato*X3 aereacion	-3,364721	0,571442	-5,89	<,0001*
X2 temp*X2 temp	3,2244099	0,835558	3,86	0,0015*
X2 temp*X3 aereacion	-0,596296	0,7446	-0,80	0,4357
X3 aereacion*X3 aereacion	-0,367756	0,594394	-0,62	0,5454
X1 sustrato*X1 sustrato*X1 sustrato	2,0092144	1,925442	1,04	0,3132
X2 temp*X2 temp*X2 temp	9,1834914	3,216904	2,85	0,0120*
X3 aereacion*X3 aereacion*X3 aereacion	-0,182753	3,378238	-0,05	0,9576

Figura 20. Modelo para la respuesta Y₄: Potencial Oxido Reducción

Response Y5 time latencia				
Parameter Estimates				
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	0,9690635	0,021738	44,58	<,0001*
X1 sustrato(10,25)	-0,42508	0,053009	-8,02	<,0001*
X2 temp(35,40)	0,1259006	0,082705	1,52	0,1487
X3 aereacion(100,400)	0,0652832	0,090483	0,72	0,4817
X1 sustrato*X1 sustrato	-0,018554	0,025458	-0,73	0,4773
X1 sustrato*X2 temp	-0,144423	0,022484	-6,42	<,0001*
X1 sustrato*X3 aereacion	0,199132	0,021418	9,30	<,0001*
X2 temp*X2 temp	-0,10452	0,031317	-3,34	0,0045*
X2 temp*X3 aereacion	-0,216874	0,027908	-7,77	<,0001*
X3 aereacion*X3 aereacion	0,312377	0,022278	14,02	<,0001*
X1 sustrato*X1 sustrato*X1 sustrato	0,5447707	0,072166	7,55	<,0001*
X2 temp*X2 temp*X2 temp	-0,054902	0,120571	-0,46	0,6554
X3 aereacion*X3 aereacion*X3 aereacion	-0,343767	0,126618	-2,71	0,0160*

Figura 21. Modelo para la respuesta Y₅: Tiempo de latencia

Response Y6 time max ufc				
Parameter Estimates				
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	7,1959172	0,382446	18,82	<,0001*
X1 sustrato(10,25)	3,4968721	0,932603	3,75	0,0019*
X2 temp(35,40)	-2,99307	1,455049	-2,06	0,0575
X3 aereacion(100,400)	7,2808524	1,591882	4,57	0,0004*
X1 sustrato*X1 sustrato	1,422373	0,447878	3,18	0,0063*
X1 sustrato*X2 temp	0,913154	0,395568	2,31	0,0356*
X1 sustrato*X3 aereacion	-1,000899	0,376808	-2,66	0,0180*
X2 temp*X2 temp	-0,053967	0,550966	-0,10	0,9233
X2 temp*X3 aereacion	1,6965921	0,490988	3,46	0,0035*
X3 aereacion*X3 aereacion	-0,270138	0,391943	-0,69	0,5012
X1 sustrato*X1 sustrato*X1 sustrato	-4,657262	1,269635	-3,67	0,0023*
X2 temp*X2 temp*X2 temp	3,6476454	2,121224	1,72	0,1061
X3 aereacion*X3 aereacion*X3 aereacion	-8,753534	2,227607	-3,93	0,0013*

Figura 22. Modelo para la respuesta Y₆: Tiempo de máxima biomasa

La Figura 23, muestra que los valores medidos son muy similares a los predichos por los modelos ajustados con m.c.o.m. con la metodología Screening SAS JMP (Sustitución forward), más el alto valor del coeficiente de regresión (RSq), indican que los modelos son de excelente bondad de ajuste; esto, estima que es válido su empleo para optimizar operativamente el proceso de producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, experimental en estudio.

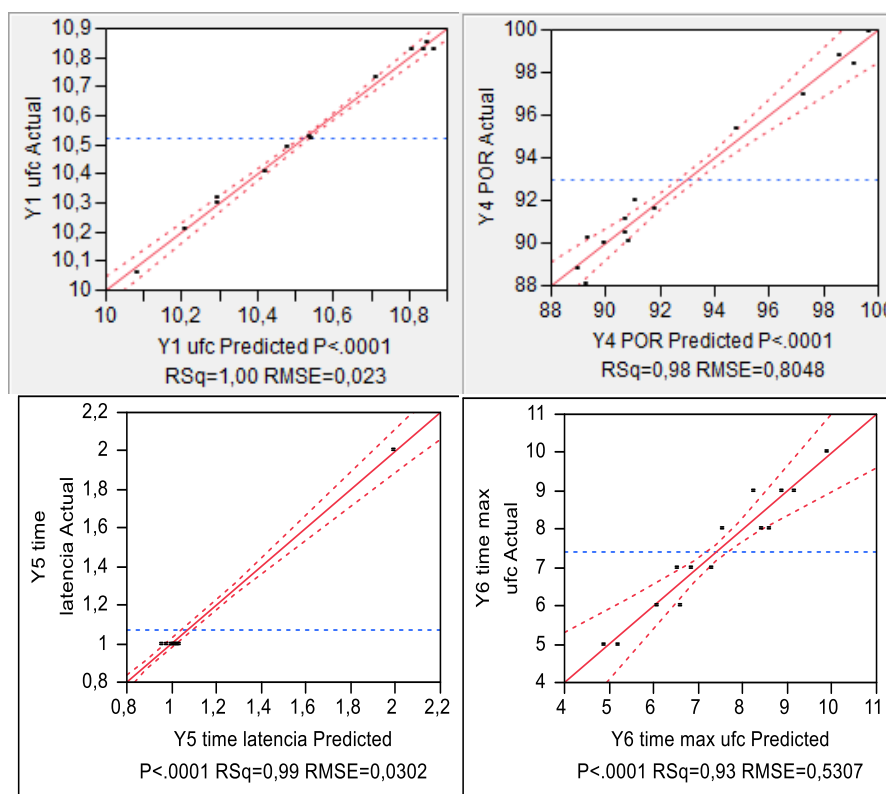


Figura 23. Gráfica de valores medidos vs Valores predichos, para la visualización de la bondad de ajuste de los modelos bajo diseño Hipercubo Latino.

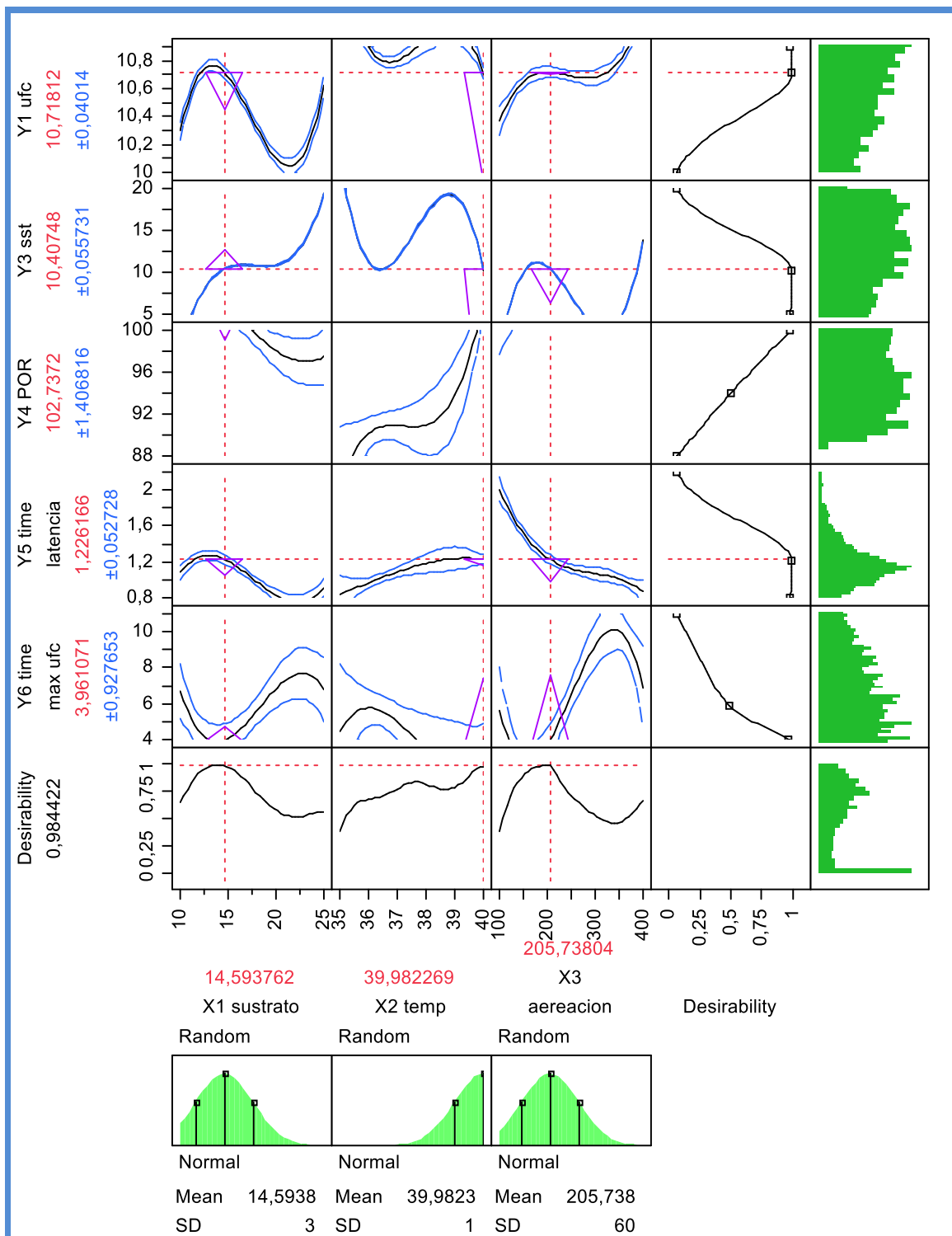


Figura 24. Optimización operativa bajo el diseño Hipercubo Latino.

Asimismo, en la Figura 24 se muestra el enfoque de la función de deseabilidad (función de conveniencia o función utilitaria de transferencia) de Derringer y Suich (1980) y Derringer (1994), que representa uno de los métodos más utilizados en la industria para la optimización de procesos con múltiples respuestas o características de calidad. En este propósito se basa en la idea de que la "calidad global" de un producto o proceso que tiene varias características de calidad (Y_i), que con solo una de ellas fuera de unos límites "deseados", el producto o proceso es no conforme. Hecha la observación anterior, los resultados de la simulación expresados en la interfaz anterior, indican que con una mezcla de 14,59 % de lactosuero enriquecido con fructosa, manteniendo la temperatura en el biorreactor en 39,98°C y garantizando una velocidad de agitación 205,74 rpm es posible obtener una cantidad de biomasa de 10,72 $\log_{10}$ Ufc/ml; con la ubicación de los sólidos totales en 10,42 ° Brix; con un potencial oxido reducción de 102,74; con un tiempo de latencia bajo de 1,22 h y un tiempo máxima biomasa de 3,96 horas.

Diseño de un controlador difuso que mejore la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

El diseño de este controlador se realizó con la herramienta de Matlab para lógica difusa, “Fuzzy Logic Tool Box”, explicada en The Math Works Inc. (2008-a), que permite de forma sencilla crear las funciones de membresía de entrada y de salida, así como las reglas difusas, y escoger el método de desdifusificación.

Para la realización del diseño, se tomó en cuenta la información sobre controladores difusos presentadas en Driankov y otros (1996), Passino y Yurkovich (1998), Wang (1997).

En relación con este último, se diseñó un control difuso que produzca un flujo apropiado de sustrato (F) al proceso; para ello se tomó en consideración la información consolidada en los objetivos anteriores, donde se evidencian dos alternativas que fundamentan la estrategia de control empleada. En ese mismo sentido una de ellas muestra que la mezcla de 14,59 % de lactosuero enriquecido con fructosa es capaz de generar una

biomasa de $10,72 \log_{10}$ Ufc/ml; con un tiempo de latencia de 1,22 horas y un tiempo máximo de biomasa 3,96 horas, logrando ofrecer una productividad de $2,70 \log_{10}$ Ufc/ml por hora mientras que la segunda opción refleja un rendimiento ligeramente más bajo por el orden de $2,17 \log_{10}$ Ufc/ml por hora (tabla 13), obtenido a partir de 13,46 % de lactosuero enriquecido con fructosa, en un tiempo de latencia de 2 horas y un tiempo máximo de 5 horas, generando una biomasa de $10,83 \log_{10}$ Ufc/ml.

Hecha la observación anterior, la estrategia de control hace énfasis en el grado de aprovechamiento del lactosuero, para la obtención de la biomasa de *Sccharomyces bouldarii*; lo que implica sacrificar un poco el rendimiento de biomasa por hora, sin descuidar el tiempo transcurrido hasta alcanzar la mayor producción de dicho microorganismo, debido a que éste definirá la fase del crecimiento que experimenta y la cantidad de flujo de sustrato requerido. En este propósito, se distingue el tiempo de latencia el cual juega un papel importante porque durante éste, el microorganismo no experimenta un incremento sustancial, por el contrario aumenta el tamaño individual de la células, el contenido proteico y la más trascendente está relacionada con el proceso de síntesis de las enzimas (Madigan y otros, 2004) necesarias para la actividad metabólica, lo cual le permitirá multiplicarse en la fase exponencial haciendo uso de los nutrientes que el lactosuero le aporta, por lo que resulta necesario que esta fase de adaptación sea lo más corta posible a fin de que se dé inicio a la duplicación celular donde los requerimientos del flujo de sustrato se incrementan porque los nutrientes comienzan a agotarse por el aumento de población de *Saccharomyces bouldarii*.

Después de lo expuesto, se decidió utilizar como modelo de inferencia difusa el de Sugeno de orden cero, usando como variables de entrada la concentración de sustrato (S) y el tiempo de producción del microorganismo (t) en el biorreactor, para controlar el flujo de sustrato (lactosuero). El método para la operación “y” es el producto, para implicación es el mínimo y la desdifusificación el promedio ponderado. La salida del CLD estará dada en función de los valores de concentración de sustrato (%) y de tiempo de producción (h). En

ese sentido en la Figura 25 se muestra un diagrama de la estructura de este controlador lógico difuso (CLD).

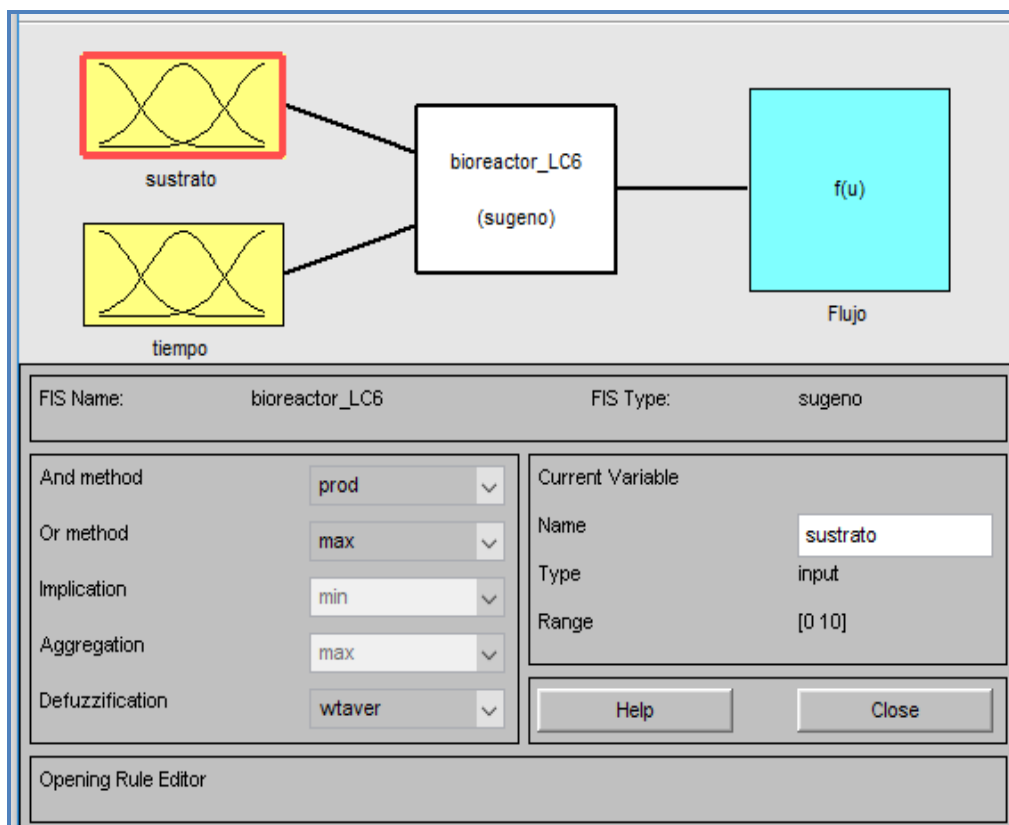


Figura 25. Estructura del Controlador Lógico Difuso CLD tipo Sugeno.

Asimismo, se crearon las funciones de membresía de la entrada, para lo cual se escogieron funciones triangulares y trapezoidales, como se muestra en la Figura 26 (Sustrato) y Figura 27 (tiempo de producción de *Saccharomyces boulardii*).

Seguidamente, se estableció el universo de discurso para la concentración de sustrato (Figura 26) entre 0 y 25 (%); asimismo, se definieron las etiquetas lingüísticas: bajo, medio y alto.

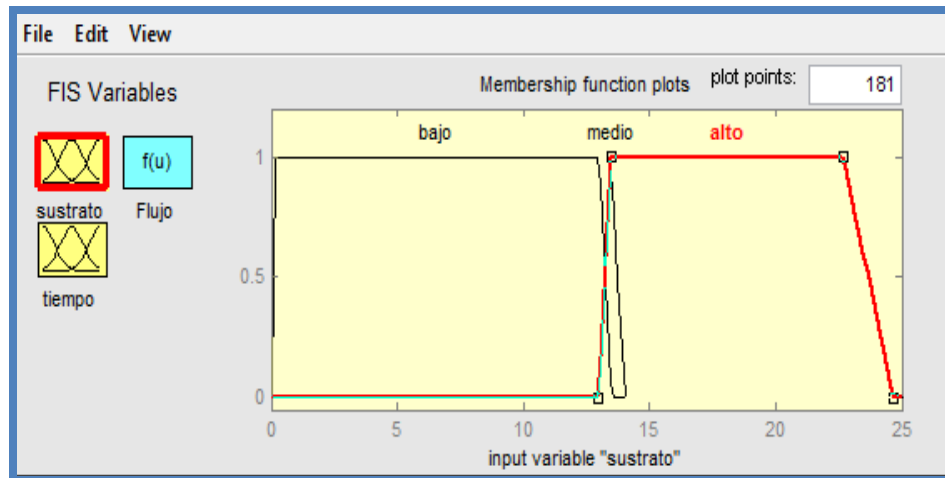


Figura 26. Funciones de Pertenencia de la Variable Sustrato

En ese mismo sentido, el universo de discurso para tiempo (Figura 27) se estableció entre 0 a 7 (h). Para tiempo de producción se definieron las etiquetas lingüísticas: pequeño, medio y alto.

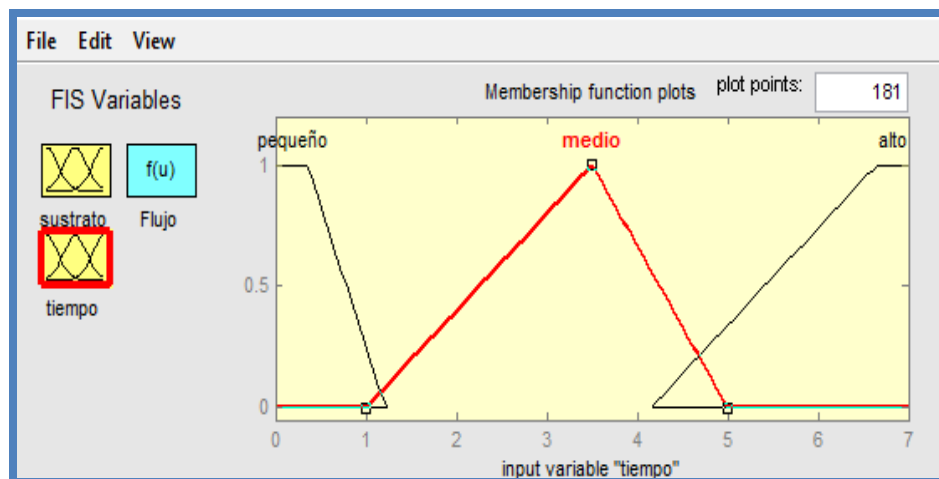


Figura 27. Funciones de Pertenencia de la Variable tiempo

En la Figura 28 que se muestra a continuación, se observa la salida y en ella se representan los cambios que debe dar la válvula como acción del control del proceso.

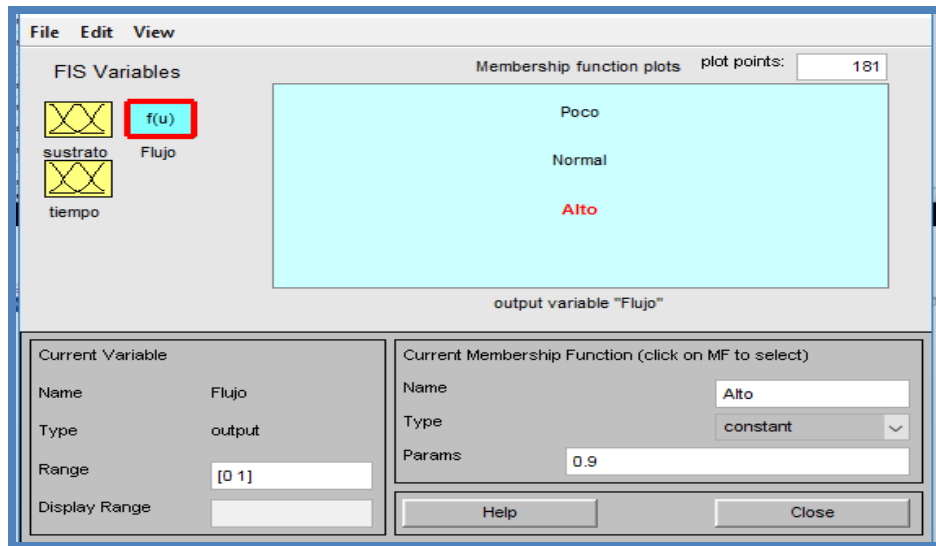


Figura 28. Variable de Salida (Flujo de Sustrato)

En igual forma en la Figura 29, se muestran las reglas utilizadas en el controlador del sistema de control.

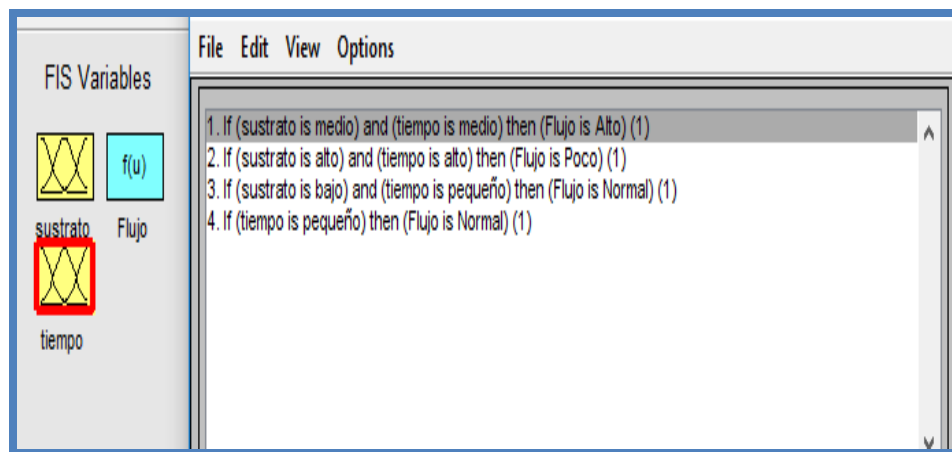


Figura 29. Reglas Difusas del Controlador tipo Sugeno para Alimentación de Sustrato

Por su parte, en la Figura 30 se muestra la superficie de acción de control.

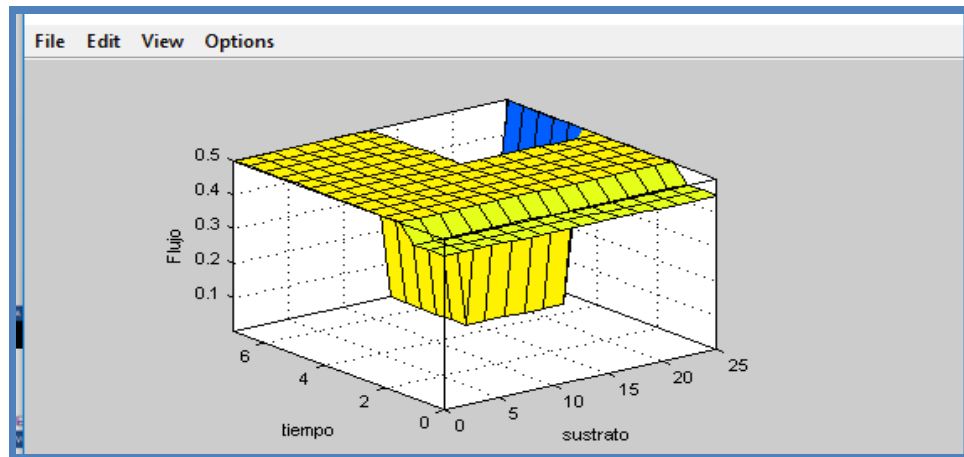


Figura 30. Superficie de Acción de Control del Controlador tipo Sugeno para Alimentación de Sustrato

La Figura 31, muestra el diagrama del sistema de control implementado utilizando el Simulink de MATLAB.

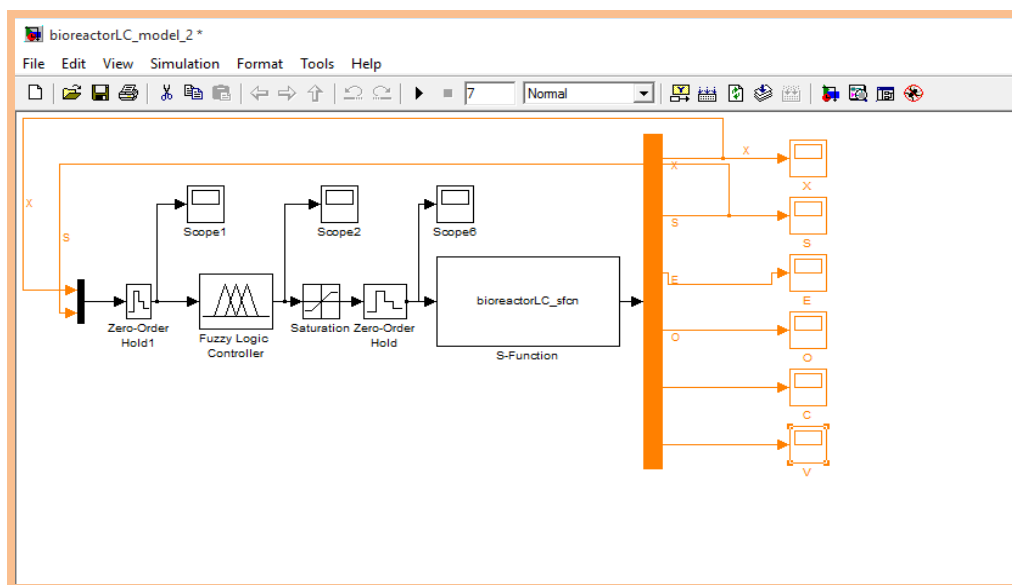


Figura 31. Diagrama del Sistema de Control Difuso del Biorreactor.

Las figuras que se muestran a continuación representan el comportamiento de las variables en el sistema controlado, donde la máxima concentración de biomasa se logra en un tiempo de 7 h con $0,164 \times 10^2 \log_{10} \text{Ufc/ml}$ (Figura 32.a), la concentración de etanol experimenta su máximo valor de 2,50 g/l alrededor de las 4 horas hasta volverse 1,60 g/l a las 7 h (Figura 32.b). La concentración de sustrato al inicio de la corrida experimentó un valor elevado por el orden de los 3 g/l que se justifica debido a que el microorganismo requiere de gran cantidad de nutrientes para lograr adaptarse al medio e iniciar su crecimiento exponencial hasta agotarse y volverse 0 g/l a las 6 horas (Figura 32.c). La concentración de dióxido de carbono experimenta su máximo valor de 0,0275 g/l alrededor de las 3,5 h, hasta volverse constante a las 7 h en un valor cercano a los 0,015g/l (Figura 32.d). La concentración de oxígeno se ubicó por el orden de los 7×10^{-3} g/l y comienza agotarse alrededor de las 4 h hasta alcanzar $0,1 \times 10^{-3}$ g/l entre las 6 y 7 horas (Figura 32.e) y el volumen máximo obtenido en el biorreactor es de aproximadamente 5,3 litros (Figura 32.f).

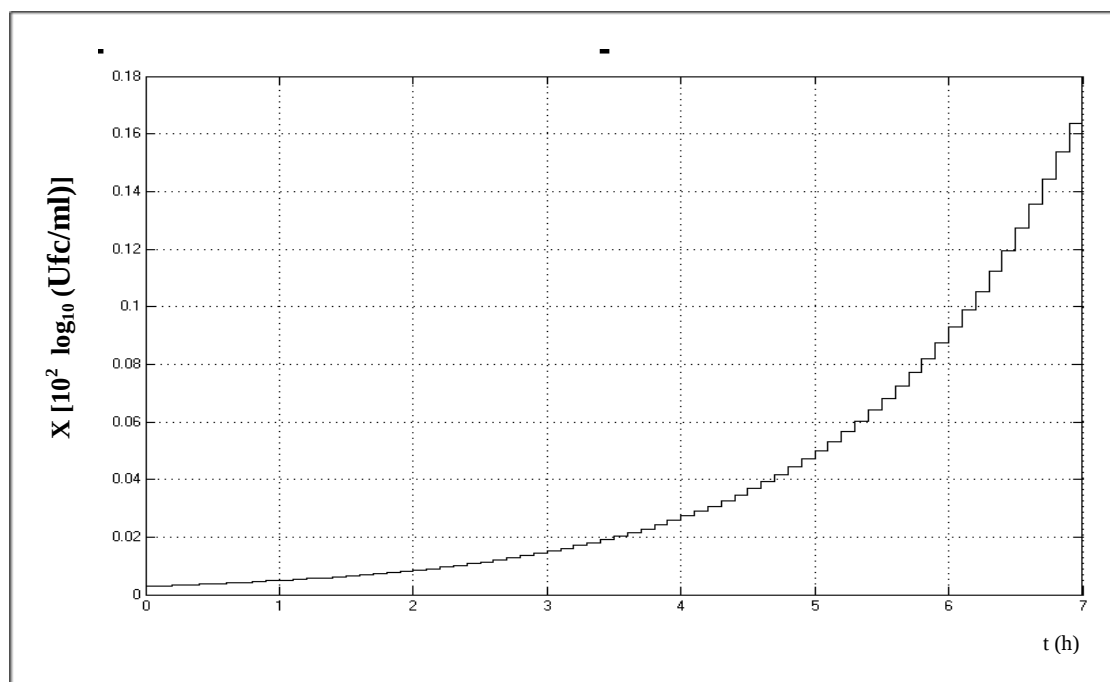


Figura 32.a. Concentración de Biomasa (g/l) vs. Tiempo (h)

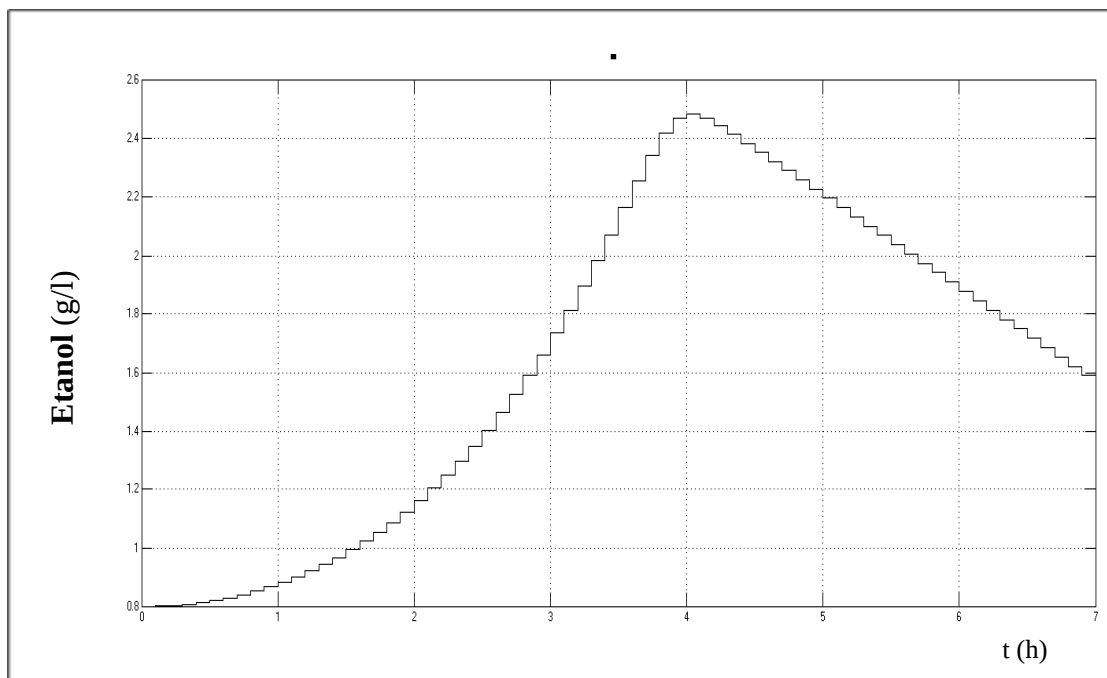


Figura 32.b. Concentración de Etanol (g/l) vs. Tiempo (h)

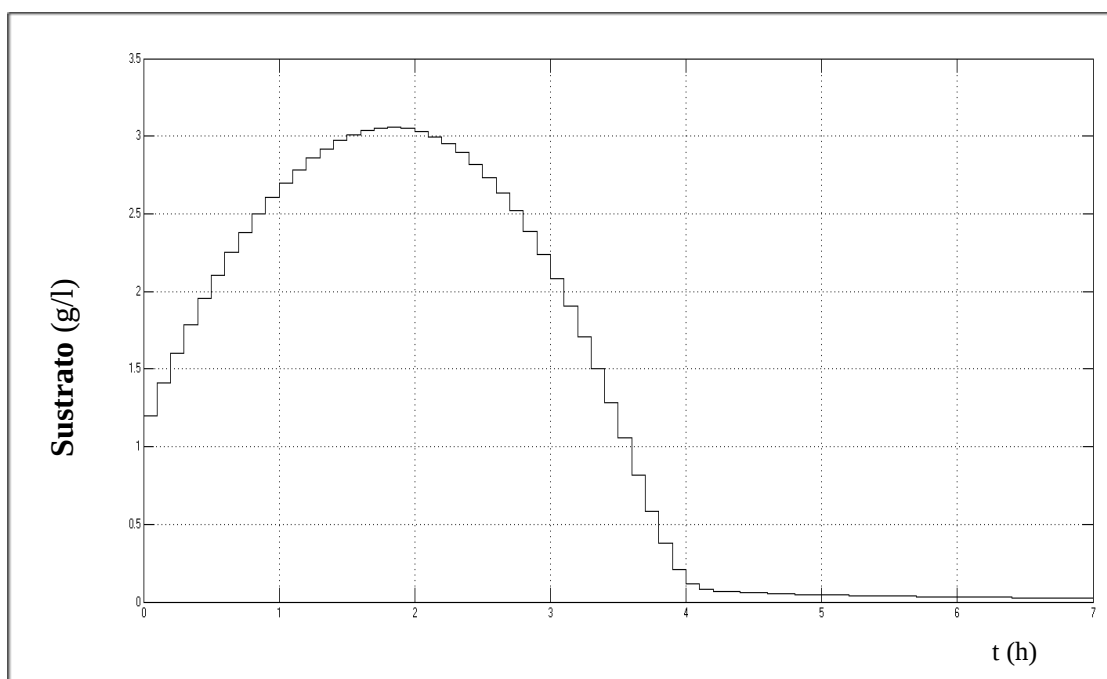


Figura 32.c. Concentración de Sustrato (g/l) vs. Tiempo (h)

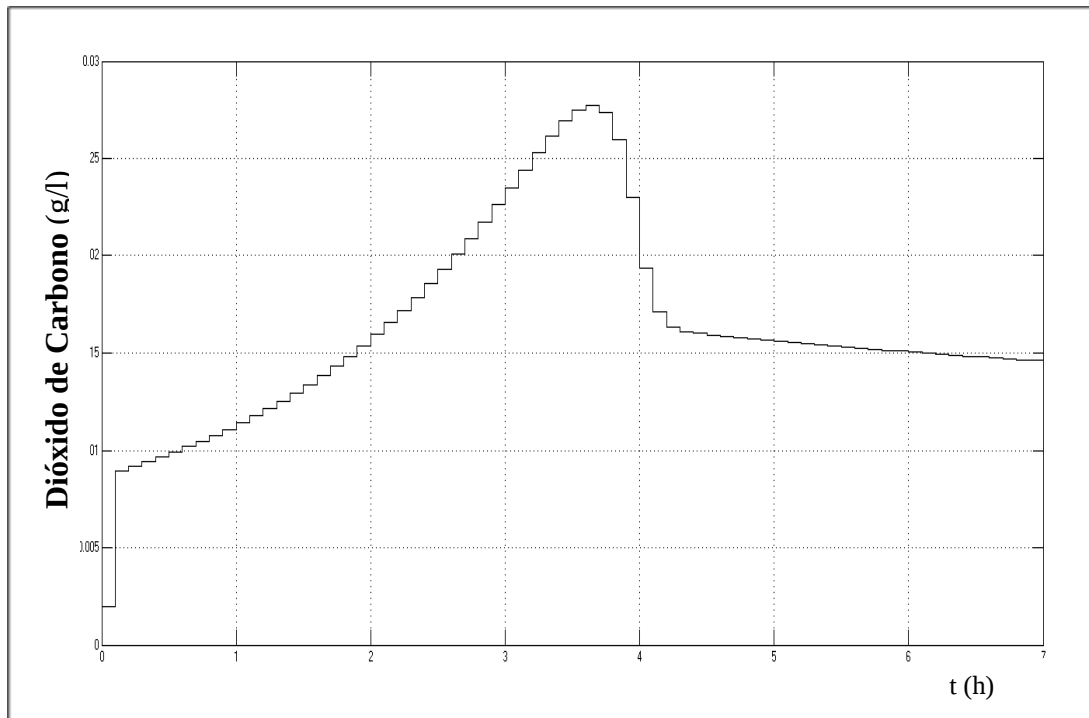


Figura 32.d. Concentración de Dioxido de Carbono (g/l) vs. Tiempo (h)

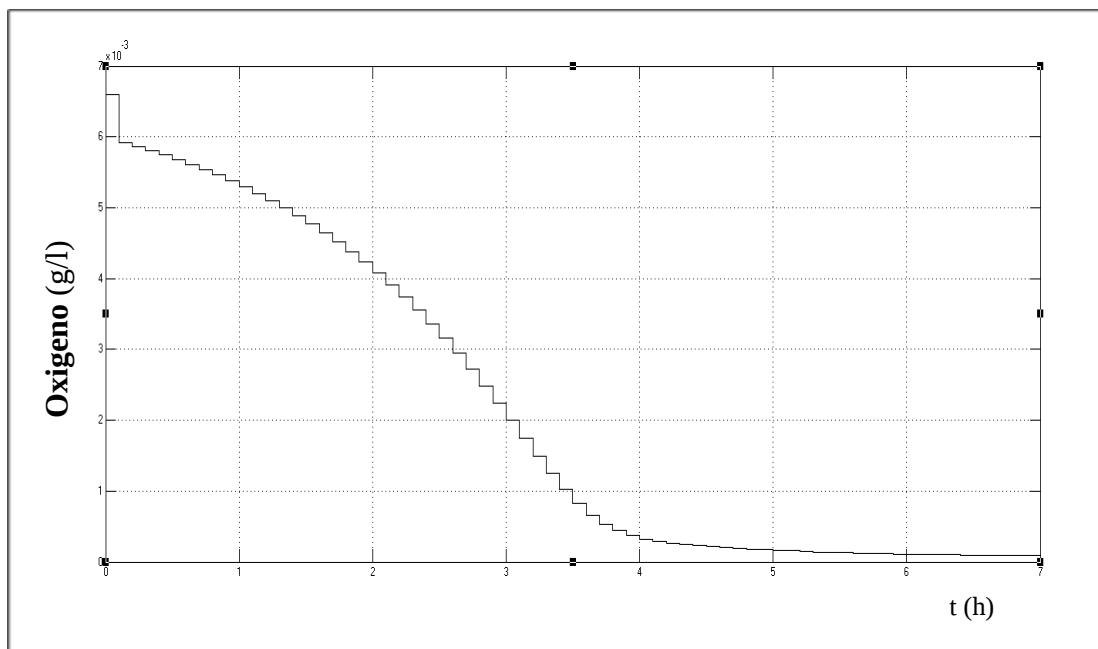


Figura 32.e. Concentración de Oxígeno (g/l) vs. Tiempo (h)

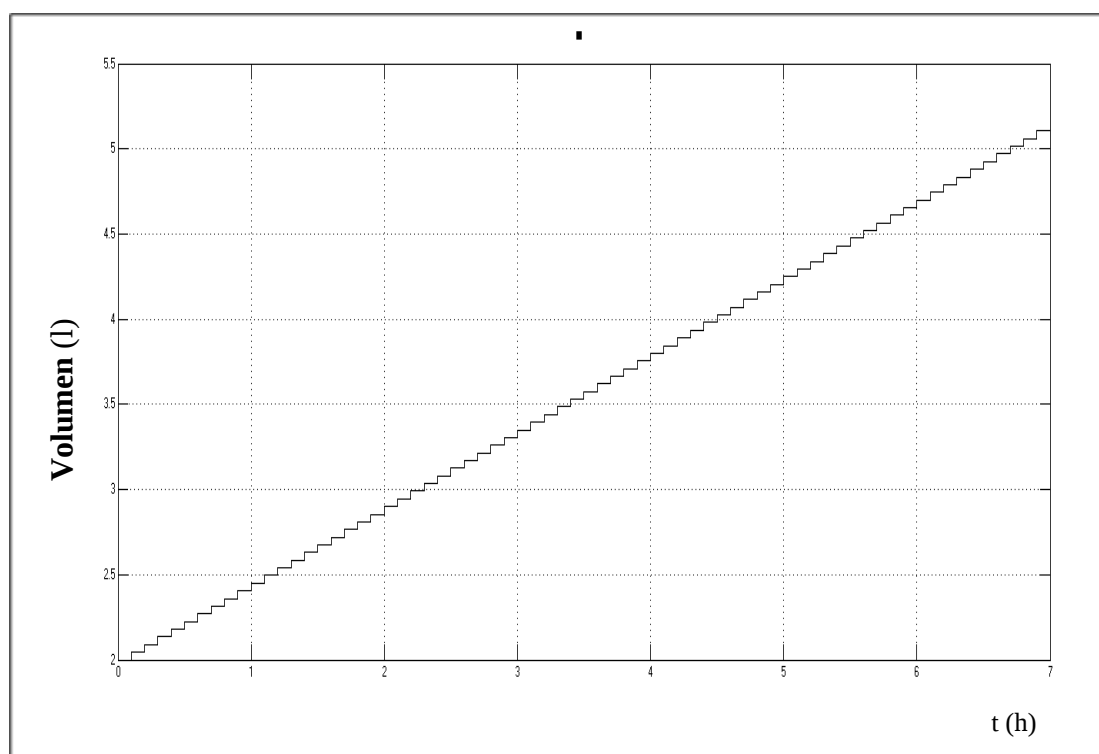


Figura 32.f. Volumen del Biorreactor (l) vs. Tiempo (h)

Finalmente puede observarse, que la estrategia de control propuesta demuestra que es posible el diseño de un control difuso que produzca un flujo apropiado de sustrato (F) al proceso, garantizando la generación de biomasa con alta productividad para una levadura cuyo proceso no ha sido estudiado a través de las herramientas de borrosidad.

Caracterización de la contribución de la lógica difusa en la producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

Para dar inicio a la caracterización es necesario verificar la correcta aplicación de los tres criterios que se plantean en la investigación y que tienen la responsabilidad de

evaluar el desempeño del sistema de producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*:

En cuanto a la **eficiencia**, se diseñó un controlador difuso orientado a obtener adecuadamente las mejores condiciones de operación, respecto a la producción promedio de biomasa por unidad de tiempo de producción. En ese mismo sentido, la productividad obtenida con el empleo de la estrategia difusa se ubica por el orden de 2,34 g/l por hora lo que indica que el enfoque produce buenas respuestas.

Según Gutiérrez 2014, p.20, **eficacia** es el grado en que se realizan las actividades planificadas y se alcanzan los resultados planificados. En este estudio, se ha planteado una producción semicontinua **eficaz** de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. Ello se ha logrado, caracterizando la infraestructura tecnológica de un sistema de producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, determinando los parámetros de experimentación para la producción semicontinua, estableciendo un modelo no lineal para la producción semicontinua, y realizando experimentaciones a nivel de laboratorio. Ello permitió demostrar la factibilidad de producir de forma económica y confiable.

Efectividad: es la trascendencia de los objetivos planteados que deben ser alcanzados. Los objetivos son trascendentes en cuanto su aporte al conocimiento universal, al ambiente, a la soberanía agroalimentaria y a la salud.

- Ayuda a mejorar la calidad de vida de los seres humanos, con un menor costo, en un menor tiempo, sin desperdiciar recursos materiales.
- Proporciona una nueva ruta para el mejor aprovechamiento del lactosuero, a fin de evitar ser desechado como efluente y de esta forma reducir su impacto al suelo, a la flora y fauna acuática.

- Genera un valor agregado al lactosuero como sustrato para el cultivo de *Saccharomyces boulardii*, proponiendo un mejor aprovechamiento de las proteínas, vitaminas y azúcares de este subproducto proveniente de la elaboración del queso.
- Es una propuesta que contribuye indirectamente a la mejora la salud pública como consecuencia de las implicaciones beneficiosas de los probióticos (*Saccharomyces boulardii*) en enfermedades como la diarrea asociada con rotavirus en lactantes y niños, y la diarrea aguda por el uso de antibióticos en adultos.

CONCLUSIONES

Luego de los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente tesis doctoral se han establecido las siguientes conclusiones:

- El caracterizar la infraestructura tecnológica para la producción del microorganismo *Saccharomyces boulardii* es la base que respalda la veracidad de la información y permite aumentar la eficiencia operativa, la capacidad de respuesta, disminuir los riesgos de fallas monitoreando la agilidad de adaptación y desarrollo de la levadura convirtiéndola, en un modelo ideal de reducción a escala para un proceso a gran escala.
- En el proceso de experimentación, el sustrato demostró ser un medio nutritivo y económico que favorece la producción de biomasa de *Saccharomyces boulardii* al poseer fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y micronutrientes (minerales). En lo que respecta al arreglo de tratamientos Hipercubo Latino utilizado, éste representó una excelente estrategia de diseño, debido a que permitió detectar los efectos asociados o cambios significativos en las respectivas respuestas tecnológicas medidas, que influyen en el metabolismo de los microorganismos y que actúan en su capacidad de generar y sintetizar nuevas células. En ese mismo sentido, fue posible ajustar modelos lineales aditivos de alto orden, con excelente bondad de ajuste, para el proceso de producción semicontinua de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*. En este propósito, los modelos ajustados y la metodología de optimización vía simulación permitieron localizar (pronosticar) condiciones operativas óptimas para el proceso de producción, indicando que con una mezcla de 14,59 % de lactosuero enriquecido con fructosa, manteniendo la temperatura en el biorreactor en 39,98°C y garantizando una velocidad de agitación 205,74 rpm es posible obtener una cantidad de biomasa de 10,72 log₁₀Ufc/ml; con la ubicación de los sólidos totales en 10,42 °Brix; con un potencial oxido reducción de

102,74; con un tiempo de latencia bajo de 1,22 h y un tiempo máxima biomasa de 3,96 horas.

- Se demostró a través de la simulación que el controlador diseñado cumple con los requerimientos del proceso bajo la estrategia de control propuesta, orientada a obtener adecuadamente las mejores condiciones de operación, en cuanto a producción promedio de biomasa por unidad de tiempo. Durante el lapso de control de 7 horas, el controlador diseñado produjo una mejor respuesta para el crecimiento microbiano de $16,4 \log_{10} \text{Ufc/ml}$. Entre la 0 y 1 hora trabajó dentro de un intervalo aceptable para la fase de latencia, la cual juega un papel importante durante el proceso de síntesis de las enzimas necesarias para la actividad metabólica, permitiendo de esta forma su multiplicación en la fase exponencial haciendo uso de los nutrientes que le provee el sustrato.
- En lo que respecta a la producción semicontinua eficaz de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, ello se ha logrado, caracterizando la infraestructura tecnológica de un sistema de producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, determinando los parámetros de experimentación para la producción semicontinua, estableciendo un modelo no lineal para la producción semicontinua, y realizando experimentaciones a nivel de laboratorio. Ello permitió demostrar la factibilidad de producir de forma económica y confiable.

De igual manera, el empleo de la estrategia difusa hizo posible obtener una productividad de 2,34 g/l por hora, lo que indica que el enfoque produce buenas respuestas.

Asimismo, la efectividad medida como la trascendencia o impacto se evidencia en su aporte al conocimiento universal, al ambiente, a la soberanía agroalimentaria y a la salud, al ayudar a mejorar la calidad de vida de los seres humanos, con un menor costo, en un menor tiempo, sin desperdiciar recursos materiales. Proporciona una nueva ruta para el mejor aprovechamiento del lactosuero, a fin de evitar ser

desechado como efluente y de esta forma reducir su impacto al suelo, a la flora y fauna acuática. Genera un valor agregado al lactosuero como sustrato para el cultivo de *Saccharomyces boulardii*, proponiendo un mejor aprovechamiento de las proteínas, vitaminas y azúcares de este subproducto proveniente de la elaboración del queso.

Es una propuesta que contribuye indirectamente a la mejora la salud pública como consecuencia de las implicaciones beneficiosas de los probióticos (*Saccharomyces boulardii*) en enfermedades la diarrea asociada con rotavirus en lactantes y niños, y la diarrea aguda por el uso de antibióticos en adultos.

RECOMENDACIONES

Para futuros trabajos de investigación en el área de control automático de bioprocesos y desarrollar otras investigaciones o innovaciones en el cultivo semicontínuo de microorganismos, se proponen las siguientes recomendaciones:

- Aplicar y desarrollar otras técnicas avanzadas de control, tales como control adaptativo, control predictivo y control neurodifuso, para automatizar y optimizar procesos de cultivo de levaduras.
- Ajustar modelos lineales aditivos de alto orden y utilizarlos en la optimización vía simulación, en el pronóstico de las condiciones operativas para la producción de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUDELO, C.; ORTEGA, R.; HOYOS, J.** (2010). Determinación de Parámetros Cinéticos de dos Inoculos Lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y Bacterias Acido Lacticas de Yogurt. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Facultad de Ciencias Agropecuarias* Vol 8, N° 2. Pp 8 – 16. Julio- Diciembre, [consulta el 26/04/2016]. Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000200002
- AGUILAR, J.; RIVAS, F.** (2001). Introducción a las Técnicas de Control Inteligente. Editores Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. 300 p.
- AIDER, M.; HALLEUX, D.; MELNIKOVA, I.** (2009). Skim Acidic Milk Whey Cryoconcentration and Assessment of its Functional Properties: Impact of Processing Conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Vol. 10, N°. 3. Pp: 334-341.
- AKHTAR, M.; DICKINSON, E.** (2007). Whey Proteinmaltodextrin Conjugates as Emulsifying Agents: An Alternative to Gum Arabic. *Journal Food Hydrocolloids*, Vol. 21. N°. 4. Pp: 607-616.
- ALARCÓN, M.** (1995). Modelo para Análisis y Conceptualización de Sistemas Inteligentes para Control de Procesos Industriales en Tiempo Real. [Artículo en línea]. [consulta el 08/11/2012]. Disponible en <https://serviciosgate.upm.es/tesis/tesis/827>
- ALCALÁ, J.** (2007). Sistemas Basados en Reglas Difusas. Módulo III del curso Controladores Lógicos. [Artículo en línea]. [consulta el 08/01/2013]. Disponible en http://wwwdi.ujaen.es/asignaturas/cl/teoria/transparencias/tema5_cl.pdf
- ALMEIDA, K.; TAMIME, A.; OLIVEIRA, M.** (2009). Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 42. N°. 2. Pp: 672–678.
- ALVARADO, J.** (2013). Utilización de Bacterias Lácticas Termoresistentes como Probióticos en la Elaboración de Salchichas. Trabajo de Grado de la Universidad Tecnológica Equinoccial, Facultad de Ciencias de la Ingeniería. Quito, Ecuador. 136 p.
- ÁLVAREZ, W.** (2008). La Naturaleza de la Investigación. Caracas, Venezuela. Editorial Biosfera. 128 p.
- ARIAS, F.** (2012). El Proyecto de Investigación. Introducción a la Metodología Científica. Sexta Edición. Caracas, Venezuela. Editorial Episteme. Pp: 67-71.

ARNAU, J. (1980). *Psicología Experimental*. D.F, México. Editorial Trillas. 1980.

ARREDONDO, T. (2014). Introducción a la lógica difusa. [Artículo en línea]. [consulta el 07/10/2012]. Disponible en <http://profesores.elo.utfsm.cl/~tarredondo/info/softcomp/Introduccion%20a%20la%20Logica%20Difusa.pdf>

ARTEAGA, H.; VÁSQUEZ, V. (2012). Control difuso del oxígeno disuelto, pH y temperatura de un biorreactor columna de burbujas en la producción de biomasa de *Candida utilis*. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Scientia Agropecuaria* Vol 2. Pp 139 – 148. [consulta el 05/10/2013]. Disponible en <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/78>.

AVILA, E. (2018). Avances en diseños de tratamientos de relleno del espacio experimental, de utilidad en modelación y simulación de sistemas complejos. Material con fines didácticos. UNELLEZ, San Carlos. Pp: 1-9.

ÁVILA, E. (2012). TEORÍA PRFD-HIVD6 (2012). Co-Optimización Estadística de Criterios en Calidad. Material con fines didácticos. Ingeniería Agroindustrial, Programa Ciencias del Agro y del Mar. UNELLEZ, San Carlos, Venezuela.

BACCOUCHE, A.; ENNOURI, M.; FELFOUL, I.; ATTIA, H. (2013). A physical stability study of whey-based prickly pear beverages. *Food Hydrocoll.* Vol. 33, N°. 2. Pp: 234-244.

BALESTRINI, M. (2006). Como se elabora el proyecto de investigación. Quinta Edición. Caracas, Venezuela. Editorial B.L Consultores y Asociados. 265p.

BARO, L.; JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ, A.; BOUZA, J. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *J. Ars. Pharmaceutica*, Vol. 42. N°. 3-4. 2. Pp: 135-145.

BASS, D. (2000). Rotavirus y Otros Agentes de la Gastroenteritis Vírica en: Behrman, R. E., Kliegman, R. M y Jenson, H. B. Nelson Tratado de Pediatría. Edit. Mc Graw – Hill – Interamericana. Madrid. 16 ed. Vol. 2 Cap.256. Pp 1093-1095.

BERGOGNE, E. (1995). Impact écologique de l'antibiothérapie. Place des micro-organismes de substitution dans le contrôle des diarrhées et colites associées aux antibiotiques. *Presse Med*, Vol. 24. Pp: 145-56.

BERRUGA, M. (1999). Desarrollos de procedimientos para el tratamiento de efluentes de quesería. Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. [Artículo en línea]. [consulta el 07/10/2012]. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/75721442/D2017801>

BET. BOLETIN ESTADISTICO TECNOLOGICO. (2010). Biotecnología. [Artículo en línea]. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva - República Argentina. N° 4. Diciembre-Marzo, [consulta el 08/11/2012]. Disponible en http://www.mincyt.gov.ar/multimedia/archivo/archivos/BET_Biotecnologia.pdf

BISQUERRA, R. (2000). Métodos de investigación educativa. Barcelona, España. Grupo editorial Ceac. 382 p.

BODDY, AV.; ELMER, GW.; MCFARLAND, LV.; LEVY, RH. (1991). Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. *Pharm.* Vol. 8, N° 6. Pp: 796-800.

BOUZA, A. (2000). Reflexiones acerca del uso de los conceptos de eficiencia, eficacia y efectividad en el sector de la salud. *Rev Cubana Salud Pública*, Vol. 26. Pp: 50-56.

BUJALANCE, M. (2006). Modificación de la Respuesta Biológica por Microorganismos Probióticos en Modelos de Animales Inmunocompetentes e Inmunocomprometidos. Tesis Doctoral. Granada. 245 p.

BUTS, J. (2005). Ejemplo de un Medicamento Probiótico: *Saccharomyces boulardii* Liofilizada. [Artículo en línea]. *Revista Científica de Gastroenterología del Perú*, Vol 25, N° 2, Abril - Junio. [consulta el 05/10/2012]. Pp: 176-188. Disponible en http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292005000200007&lng=es&nrm=iso

CALDERÓN, J. (2017). Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo. Tesis de Grado. Fundación Universidad de América, Facultad de Ingeniería. Bogotá, Colombia. 78 p.

CAMARIPANO, M. (2007). Etiología Infecciosa del Síndrome Diarreico Agudo en Niños Menores de 5 años. Tesis de Grado. Universidad de Oriente, Ciudad Bolívar, Venezuela. 40 p.

CAMPBELL, N.; REECE, J. (2007). Biología. Séptima Edición. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana, S.A. 1397 p.

CARRILLO, J. (2006). Tratamiento y Reutilización Del Suero de Leche. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Mundo Lácteo y Cárnico* N° 6. [consulta el 11/10/2012]. Pp: 28-30. Disponible en <http://mundolacteoycarnico.com/?s=Tratamiento+y+Reutilizaci%C3%B3n+Del+Suero+de+Leche>

CARRILLO, N. (2011). Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos. [Artículo en línea]. [Consulta el 07/01/2019]. Disponible en <http://www.slideshare.net/nelsycarrillo/tcnica-de-observacin>.

CASTILLO, K. (2011). Efecto de la Inhibición de Crecimiento de Microorganismos Lácticos Mediante el Empleo de Canela, Cilantro y Oligosacáridos de Quitosá. Tesis de Ingeniería. Saltillo, México. 65 p.

CÁMARA VENEZOLANA DE INDUSTRIAS LÁCTEAS (CAVILAC). (2008). La industria lechera en Venezuela. Su evolución. Caracas, Venezuela. 58 p.

CHACÓN, L.; CHAVEZ, A., RENTERÍA, A.; RODRIGUEZ, J. (2017). Proteínas del lactosuero: usos, relación con la salud y bioactividades. *Interciencia*, Vol. 42. N°. 11, Noviembre. Pp: 712-718.

CEBERIO, M.; WATZLAWICK, P. (1998). *La Construcción del Universo*. Editorial Herder. Barcelona, España. 222 p.

CLAROS, J. (2012). Estudio del Proceso de Nitrificación y Desnitrificación Vía Nitrito para el Tratamiento Biológico de Corrientes de Agua Residual con Alta Carga de Nitrógeno Amoniacal. Tesis Doctoral. Valencia, España. 254 p.

CORTÉS, F.; GIL, M. (1997). El Constructivismo Genético y las Ciencias Sociales: Líneas Básicas para una Reorganización Epistemológica. En: *La epistemología genética y la ciencia contemporánea*, de Rolando García (coord.). Editorial Gedisa. Barcelona, España. Pp:69-88.

COTERO, J. (2003). Control de Procesos. Control Clásico, Moderno y Control Inteligente. [Artículo en línea]. [consulta el 02/05/2011]. Disponible en <http://www.mde.iteso.mx/titulacion/estudio%20de%20caso/ejemplos/marco%20teorico%20en%20progreso.pdf>

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma 1126-89. (1989). Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico (Primera revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela. 11 p.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma 1337-90. (1990). Métodos para recuento de mohos y levaduras. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela. 1990. 6 p.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma 3123-94. (1994). Alimentos. Recuento de microorganismos acidúricos. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Ministerio de Fomento. Caracas, Venezuela. 6 p.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma 658-97. (1997). Determinación de Acidez Titulable para Leche y sus derivados. Pp: 1-2.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) Norma 370-97. (1997). Determinación de Proteínas para Leche y sus Derivados, Pp: 3-5.

CONTI, J.; CERIANI, M.; JULIARENA, M.; ESTABAN, E. (2012). Perfil proteico y peptídico de una base fluida para bebidas funcionales obtenidas por fermentación de lactosuero. *Información Tecnológica*, Vol. 23, N°.2. Pp: 61-70.

CRAVO, G.; CRESPO, LL. (2012). Evaluación del Crecimiento de *Lactobacillus casei* en un cultivo semicontinuo. Primer Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación en el Marco de la LOCTI y del PEII. Caracas, Venezuela. Septiembre 10 p.

CRESPO, LL. (2014). Diseño de un Plan de Calidad para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces boulardii*. *Revista La Multidisciplinariedad Investigativa*. Serie Libro PEII N° 2. Pp: 94-103.

CRESPO, LL. (2012). Medición de Eficiencia en un Cultivo de Levaduras Utilizando Análisis Envolvente de Datos. *Revista La Multidisciplinariedad Investigativa*. Serie Libro PEII N° 1. Pp: 83-97.

CRESPO, LL. (2010). Sistema de Control Difuso para la Alimentación de Sustrato en un Cultivo Semicontinuo de Levaduras. Tesis de Maestría. Barquisimeto, Venezuela. 82 p.

CUJANO, D. (2016). Determinación de la Temperatura y Tiempo Adecuado para la Obtención de Requesón Deshidratado. Tesis de Ingeniería Agroindustrial. Riobamba, Ecuador. 134 p.

DALMASSO, G.; COTTREZ, F.; IMBERT V. (2006). *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology*, Vol. 131, N°. 6. Pp: 1812–1825.

DASILVA, I. (2009). Metodología de la Investigación. [Artículo en línea]. [consulta el 02/08/2018]. Disponible en <http://aquimismoes.blogspot.com/2009/08/presentacion-y-etapas-de-la.html>

DÍAZ, A. (2003). Estudio 1.EG.33.7. Estudios sobre el sector agroalimentario, Componente B: Redes Agroalimentarias. Tramas. B-8 La trama de oleaginosas en Argentina. [Artículo en línea]. [consulta el 02/05/2012]. Disponible en www.cepal.org/argentina/noticias/paginas/7/.../Informe337B4.pdf

DIAZ, J.; ECHEZURIA, L.; PETIT, N.; CARDOZO, M.; ARIAS, A.; RISQUEZ, A. (2014). Diarrea aguda: Epidemiología, concepto, clasificación, clínica, diagnóstico, vacuna

contra rotavirus. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Arch Venez Puer Ped*, Vol 77, N° 1, Marzo, [consulta el 24/01/2019]. Pp: 29 - 40. Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492014000100007&lng=es&tlng=es.

DICIEMBRE, S. (2017). Sistemas de Control con Lógica Difusa: Métodos de Mamdani y de Takagi-Sugeno-Kang (TSK). Tesis de Matemática Computacional. Castellón de la Plana, España. 73 p.

D'ELIA, J. (2014). Situación de la Salud Pública en Venezuela. *Revista Electrónica SIC*. Vol 769, Noviembre. [Consulta el 11/04/2018]. Pp: 388-391. Disponible en http://gumilla.org/biblioteca/bases/biblo/texto/SIC2014769_388-391.pdf

DRIANKOV, D.; HELLENDORF, H.; REINFRANK, M. (1996). An Introduction to Fuzzy Control. Berlín, Alemania. Editorial Springer Verlag. 100 p.

DUCLUZEAU, R. ; BENSADA, M. (1982). Effet comparé de l'administration unique ou en continu du *Saccharomyces boulardii* sur l'établissement de diverses souches de *Candida* dans le tractus digestif de souris gnotoxéniques. *Ann Microbiol (Paris)*, Vol. 133, N° 3. Pp: 491-501.

DUPONT, H y CAPSUTO, E. (1996). Persistent diarrhea in travelers. *Revista Científica Electrónica Clinical Infectious Diseases* N° 22. Enero. [consulta el 07/12/2018]. Pp: 124-8 Disponible en http://cid.oxfordjournals.org/content/22/1/124.full.pdf?origin=publication_detail.

DURANGO, L. (2007). Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo *Saccharomyces spp.* a nivel de laboratorio. Tesis de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT. Medellín, Bogotá. 136 p.

ELGUETA, M.; GAJARDO, M.; SEPULVEDA, C. (2002). Manual de Investigación Educativa. [Artículo en línea]. [consulta el 02/08/2017]. Disponible en <http://www.lapaginadelprofe.cl/metodo/Carmen2/Carmen6.htm>

ELMER, GW.; SURAWICZ, CM.; MCFARLAND, LY. (1996). Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA*, Vol. 275, N° 11. Pp: 870-876.

ELMER, GW.; MCFARLAND, LV.; SURAWICZ, CM.; DANKOS, L.; GREENBERG, RN. (1999). Behavior of *Saccharomyces boulardii* in recurrent healthy human volunteers. *Aliment Pharmacol Ther*; 13; 1663-8.

ELPIDIA, P. (2013). Whey generalities and potential use as source of calcium from high bioavailability. *Rev. Chil. Nutr*, Vol. 40. N° 1. Pp: 397-403.

ESCALADA, M. (2010). Bioreactores. [Artículo en línea]. [consulta el 08/01/2019]. Disponible en <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/biotec1/seminarios/Reactores%20biologicos%209-2010%20Marina.pdf>

ESCOBAR, L.; ROJAS, C.; GIRALDO, G.; SANABRIA, P. (2010). Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. *Rev. Invest. Univ*, Vol. 20. Quindío. Armenia, Colombia. Pp: 42 - 49.

ESIA. (2015). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Práctica II. Tipos de bioreactores. [Artículo en línea]. [consulta el 08/11/2017]. Disponible en <https://es.scribd.com/document/290390642/bioreactores>

FARIA, J.; GARCÍA, A.; GARCÍA, A. (2003). Eficiencia en la Concentración de la Proteína del Lactosuero con una Planta Móvil de Ultrafiltración y Nanofiltración. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica FCV-LUZ*. Vol. 13, Nº 5, [consulta el 05/10/2012]. Pp: 345-347. Disponible en <http://revistas.luz.edu.ve/index.php/rc/article/viewFile/4510/4375>

FERNANDES, M.; FORNARI, R.; MAZUTTI, M.; OLIVEIRA, D.; FERREIRA, F.; CICHOSKI, A.; CANSIAN, R.; LUCCIO, M.; and TREICHEL, H. (2009). Production and Characterization of Xanthan Gum by *Xanthomonas Campestris* Using ,Cheese Whey as Sole Carbon Source. *Journal of Food Engineering*, Vol. 90, Nº. 1. Pp: 119–123.

FLORES, D. (2015). Software de riego inteligente basado en control difuso para mejorar la administración del consumo de agua en los campos del valle chicama. Tesis de Ingeniería. Trujillo, Perú. 98 p.

FOEGEDING, E.; LUCK, P. (2002). Whey Protein Products. *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition*. Academic Press, New York.. Pp: 235-236

GALICIA, A.; LAMEDA, C. (2013). Control Robusto de la Concentración de Etanol en un Proceso Semicontinuo de Levaduras. Tesis de Maestría. Barquisimeto, Venezuela,. 68 p.

GHALY, A.; KAMAL, M. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*. Vol. 38. Nº. 3. Pp: 631-644.

GONDRES, I.; LAJES, S.; RODRIGUEZ, N.; DEL CASTILLO, A. (2007). Utilización de la lógica difusa en la gestión del mantenimiento: caso de estudio. *Scientia et Technica*, Vol. 13. Nº. 34. Mayo. Pp: 25-30.

GONZÁLEZ, C. (1992). Logica difusa. Una introducción práctica. Técnicas de Softcomputing. [Artículo en línea]. [consulta 18/05/2017]. Disponible en www.esi.uclm.es/www/cglez/downloads/docencia/...Softcomputing/LogicaDifusa.pdf

GONZÁLEZ, C.; BECERRA, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CAROT, CHIRALT, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science y Technology*, Vol. 13, N°. 9-10. 2002. Pp: 334-340.

GONZÁLEZ, E.; CUNIL, S. (2002). Diagnóstico y tratamiento de la diarrea persistente en un servicio de enfermedades diarreicas agudas. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Medisan*. Vol 6. Febrero, [consulta 08/07/2012]. Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol6_2_02/san08202.htm.

GONZÁLEZ, M. (2012). Aspectos Medio Ambientales Asociados a los Procesos de la Industria Láctea. *Revista Científica Electrónica Mundo Pecuário*. Vol. 008 - N° 1. [Consulta el 10/10/20012]. Disponible en <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/34620/1/articulo2.pdf>.

GRANDA, D.; MEDINA, Y.; CULEBRAS, M.; GÓMEZ, C. (2014). Desarrollo y caracterización de una película activa biodegradable con antioxidantes (alfa-tocoferol) a partir de las proteínas del lactosuero. *VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, Vol. 21, N°. 1. Pp: 11-19.

GUNASEKARAN, S.; KO, S.; XIAO, L. (2006). Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*, Vol. 83. N°. 1. Pp: 31-40.

GUERRERO, W.; GOMEZ, C.; CASTRO, R.; GONZÁLEZ, C.; SANTOS, E. (2010). Caracterización fisicoquímica del lactosuero en El Valle de Tulancingo. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, México. Guanajuato, México, Universidad de Guanajuato. Pp: 321-328.

GUTIERREZ, H. (2014). Los retos actuales de la mejora de la calidad y la productividad en las organizaciones. *Ingeniería Industrial, Actualidad y Nuevas Tendencias*, Vol. 1. N°. 1. Pp: 109 - 124.

GUZMAN, D.; CASTAÑO, V. (2006). La lógica difusa en ingeniería: Principios, aplicaciones y futuro. *Revista Científica Ciencia y Tecnología*. Vol. 24, N°. 2, 2006. Pp: 87-107.

HA, E.; ZEMEL, M. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol. 14. N°. 5. Pp: 251- 258.

HELLMANN, M. (2001). Fuzzy Logic Introduction. [Artículo en línea]. Université de Rennes, France. [consulta el 24/04/2012]. Disponible en <http://www.sau.ac.in/~vivek/softcomp/fuzzyintro.pdf>

HEMSON, M. (2006). Biochemical Reactor Modeling and Control: Exploiting Cellular Biology to Manufacture High Value Products. *Revista Científica Electronica IEEE Control Systems Magazine*, Vol. 26, 2006, [consulta el 02/08/2011]. Pp. 54-62. Disponible en <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=17953488>

HERNÁNDEZ, A. (2008). La Lógica difusa. Características y Aplicaciones. [Artículo en línea]. [consulta el 10/10/2012]. Disponible en <http://www.ilustrados.com/documentos/logica-difusa-caracteristicas-aplicaciones-050208.doc>

HERNÁNDEZ, L.; MUÑOZ, H.; CLAROS, J. (2010). Recolección de la Información. [Artículo en línea]. [Consulta el 07/01/2018]. Disponible en <http://www.slideshare.net/SKAYLER/tc5-metodologia>.

HERNÁNDEZ, R., FERNÁNDEZ, C., BAPTISTA, P. (2014). Metodología de la Investigación. Sexta Edición. D.F, México. Editorial McGraw-Hill. Pp: 196-214.

HIDALGO, M y LARA, E. (2011). Diseño de un Biorreactor y Conducción de un Biogás generado por las excretas de Ganado Vacuno, Estación TUNSHI –ESPOCH. Tesis de Grado en Ingeniería en Biotecnología Ambiental. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas. Riobamba, Ecuador, 2011. 181 p.

HINRICHS, R.; GOTZ, J.; NOLL, M.; WOLFSCHOON, A.; EIBEL, H.; WEISSER, H. (2004). Characterization of different treated whey protein concentrates by means of lowresolution nuclear magnetic resonance. *International Dairy Journal*, Vol. 14. N°. 9. Pp: 817-827.

HURTADO, J. (2012). Metodología de la Investigación. Guía para la comprensión holística de la ciencia. 4 ta Edición. Caracas, Venezuela. Ediciones Quirón. 1327 p.

HURTADO, I.; TORO, J. (2007). Paradigmas y Métodos de Investigación en Tiempos de Cambios. Editorial CEC S.A. Caracas, Venezuela. 168 p.

IBRAHIM, F.; BABIKER, E.; YOUSIF, N.; TINAY, A. (2005). Effect of fermentation on biochemical and sensory characteristics of sorghum flour supplemented with whey protein. *Food Chemistry*, Vol. 92. N°. 2. Pp: 285-292.

IM, E.; POTHOUKAKIS, C. (2010). Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. *Gastroenterol Clin Biol*. Vol. 34, N°1. Pp: 62-70.

INTERNATIONAL STANDARD (ISO) Norma 4833-1: 2013 (E). (2013). Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30 ° C mediante la técnica de siembra en profundidad. Suiza. Septiembre. 8 p.

IRAPORDA, C. (2016). Evaluación de la actividad biológica de leches fermentadas artesanales: función de la fracción no microbiana. Tesis Doctoral. La Plata-Provincia de Buenos Aires, Argentina. 252 p.

JANG, J.; SUN, C.; MIZUTANI, E. (2001). Neuro-Fuzzy And Soft Computing – A computational approach to learning and machine intelligence. Prentice-Hall, 2001. Pp: 30-40.

JÁUREGI, P.; WELDERUFEL, F. (2010). Added-value protein products from whey. *Nutrafoods*, Vol. 9. N°. 1. Pp: 13-23.

JELÉN, P. (2003). Whey processing. Utilization and Products. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, Roginski H, Fuquay JW and Fox PF (eds), Vol. 4. Pp: 2739-2745.

JARAMILLO, L. (2003)- ¿Qué es epistemología?. *Redalyc Cinta de Moebio*, N°. 18. Pp: 174-178.

KERLINGER, F.; HOWARD, L. (2001). Investigación del comportamiento. Métodos de Investigación en Ciencias Sociales. 4 ta Edición. D.F, México. Editorial Mc Graw Hill. 850 p.

KLEIN, SM.; ELMER, GW.; MCFARLAND, LV.; SURAWICZ, CM.; LEVY, RH. (1993). Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers, *Pharm Res*, Vol. 10, N°. 11. Pp: 1615-1619.

KOUTINAS, A.; PAPAPOSTOLOU, H.; DIMITRELLOU, D.; KOPSAHELIS, N.; KATECHAKI, E.; BEKATOROU, A.; BOSNEA, L. (2009). Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology*, Vol. 100. N°. 15. Pp: 3734-3739.

KUHN, T. (2001). La Estructura de las Revoluciones Científicas. FCE. Décima edición. Bogotá, Colombia.

LAM, R.; HERNANDEZ, P. (2008). Los términos: eficiencia, eficacia y efectividad ¿son sinónimos en el área de la salud?. *Revista Científica Electrónica Cubana Hematol Inmunol*,

Vol. 24. N° 2. Mayo-Agosto. Pp: 1-6. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892008000200009

LEE, C. (1999). Logic in Control System: Fuzzy Logic Controllers. 1063-IEEE Trans. On Systems, man and Cybernetics, 20, Parts I and II. Vol SMC-20. N° 2. Marzo-Abril. Pp: 404-435.

LEE, L.; TENG, W.; OUWEHAND, T.; SALMINEN S. (2000). Quantitative Approach in the Study of Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Intestinal Cells and Their Competition with Enterobacteria.. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Appl Env Microbiol.* Vol. 66, N°. 9. [consulta el 10/09/2012]. Pp. 3692-3697. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92208/>

LEROY, DE V. (2001). Growth of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus Sakei* Strain CTC 494 in MRS Broth is Strongly Reduced Due to Nutrient Exhaustion: a Nutrient Depletion Model for the Growth of Lactic Acid Bacteria. *Revista Científica Electrónica Appl Environ Microbiol*; 67. [Consulta el 08/08/20012]. Pp. 4407-4413. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93183/>

LINARES, G.; DÍAZ, L.; HARO, R.; PUELLES, J.; ARANA, L.; RETTO, P.; RICCE, C. (2015). Efecto de las diferentes proporciones de pulpa de frutas cítricas en la aceptabilidad sensorial de una bebida fermentada y proteica elaborada a partir de lactosuero residual. *Agroindustr. Sci.* Vol. 4. N°. 2. Pp: 65-73.

LINDEN, G.; LORIENT, D. (1996). Bioquímica Agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola. Editorial Acribia, Zaragoza. España. 454 p.

LIU, X.; CHUNG, K.; YANG, S.; YOUSEF, A. (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Journal Process Biochemistry.* Vol. 40. Pp: 13-24.

LONDOÑO, M.; SEPÚLVEDA, J.; HERNÁNDEZ, A.; PARRA, J. (2008). Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *lactobacillus casei*. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín.* Vol. 61. N°. 1. Pp: 4409-4421.

LONDOÑO, M. (2006). Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. Perspectivas en nutrición humana. *Revista Perspectivas en Nutrición Humana*, Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia. Vol. 16. Pp: 11-20.

LÓPEZ, E.; GARCÍA, V.; PERALTA, A. (2010). Estudio de Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Industria Química. [Artículo en línea]. [consulta el 16/10/2012]. Disponible en www.ara.mil.ar/archivos/Docs/251LOPEZ.pdf

LÔPEZ, J.; PRADO, J. (2015). Uso de lactosuero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015. Tesis de Ingeniería. Managua, Nicaragua. 94 p.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. (2004). Biología de los Microorganismos. Prentice Hall, Madrid.

MAILLIÉ, M.; NGUYEN VAN, P.; BERTOUT, S.; VAILLANT, C.; BASTID, LM. (2001). Genotypic study of *Saccharomyces boulardii* compared to the *Saccharomyces sensu stricto* complex species. *J Mycol Med*, Vol. 11. Pp : 19-25.

MALLO, C.; MERLO, J. (1995). Control de gestión y control presupuestario. Madrid, España. Editorial McGraw-Hill. 414 p.

MAMDANI, E. (1974). Application of fuzzy algorithm for simple dynamic plant. *IEEE Proceedings-Control Theory and Applications*, Vol. 121, No.12. Pp: 1585-1588.

MARCANO, H. (1994). Evaluación Epidemiológica de las Diarreas en el Estado Bolívar. Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de Médico cirujano. Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias de la Salud Profesor Francisco Batistini Casalta. Ciudad Bolivar, Venezuela. 43 p.

MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C.; GISBERT, J.; KUIPERS, E. ; AXON, BAZZOLI, A.; GASBARRINI, A.; ATHERTON, J.; GRAHAM, D.; HUNT, R.; MOAYYEDI, P.; ROKKAS, T.; RUGGE, M.; SELGRAD, M.; SUERBAUM, S.; SUGANO, EL-OMAR, K. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, Vo1. 66, N°. 1. Pp: 6-30.

MÁRQUEZ, M.; RAMOS, L.; BALDERRAMA, B. (2018). Stable fuzzy control and observer via LMIs in a fermentation process. *Journal of Computational Science*, Vo1. 27, N°. 1. Pp: 192-198.

MÁRQUEZ, M.; GARCÍA, A.; RAMOS, J.; MÁRQUEZ, C.; BAÑOS, U. (2014). Control predictivo usando un modelo difuso para la tasa de crecimiento bacteriano. *Research in Computing Science*, Vol. 73. Pp: 117-128.

MÁRQUEZ, M.; MUÑOZ, F.; GARCÍA, A. (2013). Lógica Difusa Aplicada al Control de Seguimiento en un Reactor Biológico. *Congreso Internacional de Investigación*, Vo1. 5, N°. 3. Celaya, Guanajuato, México. Pp: 2009-2014.

MARTEAU, PR. ; DE VRESE, M. ; CELLIER, O. ; SCHREZENMEIR, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr*, Vol. 73, N°. 2. Pp: 430-436.

McFARLAND, LV.; BERNASCONI, P. (1993). *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbiol Ecology Health Dis*, Vol. 6, N°. 4. Pp: 157-171.

MEJIA, C. (1998). Indicadores de efectividad y eficacia. [Artículo en línea]. [consulta 16/11/2019].
Disponible en http://www.planning.com.co/bd/valor_agregado/Octubre1998.pdf

MENDOZA, G. (2015). Guía para la Elaboración del Anteproyecto de Tesis Doctoral. Material con fines didácticos. Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, Mención Productividad. UNEXPO, Barquisimeto, Venezuela.

MENZELLA, H. (2017). Procesos Biotecnológicos II. Crecimiento microbiano-Esterilización-Tipos de Biorreactores. [Artículo en línea]. [consulta 16/02/2018].
Disponible en http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/147099/mod_resource/content/0/310817.pdf

MIRANDA, O.; FONSECA, P.; PONCE, I.; CEDEÑO, C.; RIVRO, L.; MARTI, L. (2007). Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso. Características Distintivas y Control de Calidad. *Rev. Cub. Alim. Nutr*, Vol. 17, N°. 2. Pp: 103-108.

MIRANDA, O.; PONCE, I.; FONSECA, P. (2009). Características fisicoquímicas de sueros de queso dulce y ácido producidos en el combinado de quesos de Bayamo. *Rev Cub Aliment Nutr*, Vol. 19, N°. 1. Pp: 21-25.

MOKATE, K. (1999). Eficiencia, eficacia, equidad y sostenibilidad. ¿Que queremos decir ?. [Artículo en línea]. [Consulta el 20/09/2018]. Disponible en: https://www.cepal.org/ilpes/noticias/paginas/.../gover_2006_03_eficacia_eficiencia.pdf

MOLERO, M.; CASTRO, G.; BRIÑEZ, W. (2017). Evaluación Fisicoquímica del Lactosuero Obtenido de la Producción de Queso Blanco Aplicando un Método Artesanal. *Revista Científica Electrónica Revicyhluz*, Vol. 27. N°. 3. Mayo-Junio, [consulta el 08/08/2017]. Pp: 149-153. Disponible en <http://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/22729/22603>

MOLINA, M. (2008). Efecto probiótico de *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* en cuyes (*Cavia porcellus*) de engorde. Tesis de Ingeniería Agropecuaria. Sangolquí, Ecuador. 139 p.

MORALES, G. (2002). Introducción a la lógica difusa. [Artículo en línea]. [consulta el 08/06/2017]. Disponible en <http://delta.cs.cinvestav.mx/~gmorales/ldifll/ldifll.pdf>

MORAN, M; RAMÓN, D; COSTA, J; LÓPEZ, F; ARRIOLA, A; MARTÍN, A; CUÉLLAR, R; CAMACHO, R; RODRÍGUEZ, F. (2005). La Biotecnología: La Nueva Industria del Siglo XXI. [Artículo en línea]. Documentos de Divulgación. [consulta el 16/10/2012]. Disponible en www.genes.org/assets_db/publications/documents/pub_83_d.pdf

MORRISON, R. (2015) Pragmatismo: una Antigua epistemología para el actual paradigma social de la ocupación. *Revista Científica Electrónica TOG (A Coruña)*, vol. 12. n°. 21, Mayo. [consulta el 01/12/2018]. Pp: 1-26. Disponible en <http://www.revistatog.com/num21/pdfs/colab1.pdf>

MOTA, Y.; MOSQUERA, W. (2015). Aprovechamiento del lactosuero y sus componentes como materia prima en la industria de alimentos. *@limentech Ciencia y Tecnología Alimentaria*, Vol. 13, N°. 1. Pp: 81-91.

MUKHOPADHYAY, R.; CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B.; BANERJEE, P.; GUHA, A. (2005). Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal*, Vol. 15. N°. 3. Pp: 299-303.

MUÑI, A.; PAEZ, G.; FARÍA, J.; FERRER, J.; RAMONES, E. (2005). Eficiencia de un Sistema de Ultrafiltración / Nanofiltración Tangencial en Serie para el Fraccionamiento y Concentración del Lactosuero. *Revista Científica FCV-LUZ*, Vol. 15, N° 4. Pp: 361–367.

NAVARRO, C. (2014). Epistemología y Metodología. D.F, México. Grupo Editorial Patria. 2014. Pp: 4-10.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (2002). Análisis de Salud-Datos de Salud de Países-Venezuela. [Artículo en línea]. [consulta 16/01/2019]. Disponible en <http://165.158.1.110/spanish/prfflven.html>.

ORTIZ, A.; REUTO, J.; FAJARDO, E.; SARMIENTO, S.; AGUIRRE, A; ARBELÁEZ, G; GÓMEZ, D.; QUEVEDO, B. (2008). Evaluación de la Capacidad Probiótica in Vitro de una Cepa Nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Científica Electrónica Redalyc Universitas Scientiarum Pontificia Universidad Javeriana Colombia*, Vol. 13, Núm. 2. Julio-Septiembre. [Consulta el 11/08/2012]. Pp. 138-148. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49913205>

PANESAR, P. (2007). Lactose hydrolysis in whole milk using immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells. *Am. J. Food Technol.*, Vol. 2. N°4. Pp: 288-294.

PANESAR, P.; KENNEDY, J.; GANDHI, D.; BUNKO, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, Vol. 105. Pp: 1-14.

PARDO, S.; GALVAGNO, M.; CERRUTTI, P. (2009). Estudios de la Viabilidad y la Vitalidad Frente al Congelado de la Levadura Probiótica *Saccharomyces boulardii*: Efecto del Preacondicionamiento Fisiológico. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Iberoamericana de Micología*, Vol. 26. N° 2. [consulta el 16/07/2012]. Pp: 155-160. Disponible en <http://www.reviberoammicol.com/2009-26/155160.pdf>.

PARIS, R. (2009). Obtención de exopolisacáridos de interés industrial a partir del lactosuero y permeatos. Tesis de doctorado. Facultad de microbiología, Universidad de Granada. Granada, España. 246 p.

PARRA, A. (2009). Lactosuero: Importancia en la Industria de Alimentos. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Redalyc* Facultad Nacional de Agronomía - Medellín, vol. 62. N°. 1, [consulta el 16/08/2012]. Pp. 4967- 4982. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=179915377021>

PASSINO, K.; YURKOVICH, S. (1998). Fuzzy Control. Addison Wesley. 495 p.

PÉREZ, J.; RAMÍREZ, R.; CRAVO G.; CRESPO LL. (2016). Evaluación del crecimiento de *Saccharomyces boulardii* utilizando como sustrato inulina extraída a partir de la cebolla (*allium cepa*). *Revista Agrollania*, Vol. 13. Enero-Diciembre. Pág. 41.

PESCUMMA, M.; HÉRBET, E.; MOZZI, F.; FONT, G. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, Vol. 25. N°. 3. Pp: 442–451.

PIAGET, J. (1979). Tratado de lógica y conocimiento científico (1). Naturaleza y métodos de la epistemología. Buenos Aires, Argentina. Editorial Paidós.

PLAN NACIONAL SIMON BOLIVAR. PNSB. (2013). Segundo Plan Socialista de Desarrollo Económico y Social de la Nación 2013-2019. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 6118 Extraordinaria. Caracas-Venezuela.

POTHOULAKIS, C. (2009). Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther*, Vol. 30, N° 8. Pp: 826–833.

PUIG, I. (2008). Conceptos Avanzados de Seguridad: Lógica Difusa. RADWARE antivirus. [Artículo en línea]. [consulta el 24/04/2012]. Disponible en <http://www.cesca.es/promocio/congressos/radware/LogicaDifusaTecnica.pdf>.

QUIJANO, S. (2006). Dirección de recursos humanos y consultoría en las organizaciones. Barcelona, España. Icaria Editorial S.A.

REYES, C.; BAUTISTA, L.; GALVIS, E. (2012). Noica: Herramienta para el Desarrollo de Modelos a Gran Escala en Lógica Difusa. Congreso Internacional de Investigación en Nuevas Tecnologías Informáticas - CIINTI 2012. 14 Septiembre 2012. Disponible en <http://ciinti.info/memorias2012>.

RIETVELD, F.; ALAMO, G.; NATERA, L. (2006). Hacia una metodología para la investigación tecnológica. Maracaibo, Venezuela. Astro Data Editorial S.A.

RIQUELME, L. (2010). Desarrollo por ultrafiltración de un concentrado proteico a partir de lactosuero. Tesis de Especialización de la Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogota, Colombia. 48p.

RIVERA, M.; SUAREZ, D. (2010). Diseño y Construcción de un Bioreactor Batch Aerobio para Cultivo de Bacterias Biodegradadoras de Petróleo. Tesis de Pregrado de la Escuela de Ingeniería Química. Riobamba, Ecuador. 103 p.

RODRÍGUEZ, M.; ARRIBAS, B; CAMUESCO, D.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. (2008). Aplicaciones Terapéuticas de los Probióticos. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Ars Pharm. Vol 49. N° 1.* [consulta el 22/01/2019]. Pp: 5- 30. Disponible en <http://hdl.handle.net/10481/27657>

ROJAS, Y.; NODA, L.; CRESPO, LI. (2017). Efecto de los Sustratos Mango (*Mangifera indica*), Inulina (*Inula helenium*) y Lechada de maíz (*Zea mays var. saccharata*) en la Producción Eficiente de *Saccharomyces boulardii*. Memorias de las XXII Jornadas Técnicas de Creación Intelectual y VI de Postgrado, Unellez. San Carlos, Venezuela. Noviembre. Pp: 231-237.

ROJAS, M.; JAIMES, L, VALENCIA, M. (2018). Efectividad, eficacia y eficiencia en equipos de trabajo. *Revista Espacios*, Vol. 39, N° 6. Pp: 11-26.

SABINO, C. (1992). El proceso de investigación. Editorial Panapo. Caracas-Venezuela. 1992. 168 p.

SALAZAR, N. (1999). Establecimiento de las Condiciones Adecuadas para la Fabricación de Suero en Polvo a partir del Suero Producido en la Elaboración del Queso tipo Turrialba Mediante la Técnica de Secado por Atomización. Tesis Licenciatura. Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 74 p.

SAS JMP 8. (2014). Software SAS Institute Inc. JMP business unit SAS.JMP: Jonhn's macintosh program.

SHAIKH, S.; RATHI, S.; PAWAR, V.; AGARKAR, B. (2001). Studies on Development of a process for preparation of fermented carbonated whey beverage. *Eur. Food Res. Technol*, Vol. 38. N°. 5. Pp: 519-521.

SWIDSINSKI, A.; LOENING-BAUCKE, V.; KIRSCH, S. (2010). Functional biostructure of colonic microbiota (central fermenting area, germinal stock area and separating mucus layer) in healthy subjects and patients with diarrhea treated with *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterol Clin Biol*. Vol. 34, N°. 2. Pp: 79-92.

SOSA, M. (2007). Inteligencia artificial en la gestion financiera empresarial. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Redalyc* Pensamiento y Gestión Universidad del Norte Barranquilla- Colombia; N° 23, Diciembre. [consulta el 11/10/2012]. Pp: 153-186. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=64602307>

SPAHN, G.; BAEZA, R.; SANTIAGO, L.; PILOSO, A. (2008). Whey protein concentrate/ λ carrageenan systems: Effect of processing parameters on the dynamics of gelation and gel properties. *Food Hydrocolloids*, Vol. 22. N°. 8. Pp: 1504–1512.

STREFEZZA, M. (2009). Lógica difusa, un punto de vista. *Revista Científica Ciencia e Ingeniería*, Vol. 30, No. 3, Agosto-Noviembre. Pp: 259-268.

SUBAME. SUBSECRETARIA DE AGROINDUSTRIAS Y MERCADOS. (2009). Valorización: De residuo Contaminante a Producto de Alto Valor Agregado. [Artículo en línea]. [consulta el 11/10/2012]. Disponible en http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_44/cadenas/lacteos_sueros_lecheria.html.

SUGENO, M. (1985). Fuzzy identification of systems and its applications to modeling and control. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics smc*, Vol. 15, N°. 1, Enero. Pp: 116-132.

TAMAYO, M. (2004). Proceso de la Investigación Científica. 4ta Edición. Editorial México S.A. Limusa. 175 p.

THE MATH WORKS INC. (2008-a), Fuzzy Logic Toolbox™ 2 Users Guide. MATLAB ver 7.6.0.324.

THOMAS, S.; PRZESDZING, I.; METZKE, D. (2009). *Saccharomyces boulardii* inhibits lipopolysaccharide-induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation. *Clin Exp Immunol*. Vol. 156, N°. 1, 2009. Pp: 56:78.

THOMAS, S.; METZKE, D.; SCHMITZ, J. (2011). Anti-inflammatory effects of *Saccharomyces boulardii* mediated by myeloid dendritic cells from patients with crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Vol. 301, Nº. 6. Pp: 1083 - 1092.

THUILLIER, P. (1992). Las pasiones del conocimiento. Madrid: Alianza.

TINCATI, C.; BIASIN, M.; BANDERA, A. (2009). Early initiation of highly active antiretroviral therapy fails to reverse immunovirological abnormalities in gut-associated lymphoid tissue induced by acute HIV infection. *Antivir Ther*. Vol.14, Nº. 3. Pp:321–330.

TORMO, R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *An Pediatr, Monogr*, Vol. 4. Nº. 1. Pp: 30-41.

VALENCIA, D y RAMÍREZ, M. (2009). La Industria de la Leche y la Contaminación del Agua. *Revista Elementos*, Vol 73. Pp: 27-31.

VARGHESE, K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A. (2014). Moisture Sorption Characteristics of Freeze Dried Whey- Grape Beverage Mix. *J. Food Sci. Technol*, Vol. 51. Nº. 10. Pp: 2734-2740.

VASQUEZ, M. (2007). Fundamentos de la Determinación de Parámetros Cinéticos para Microorganismos de Interés en Tratamiento Térmico de Alimentos. [Artículo en línea]. *Revista Científica Electrónica Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*; Nº 1, Diciembre. [consulta el 26/04/2016]. Pp: 1-14. Disponible en <http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No1-Vol-1/TSIA-1%281%29-Vazquez-Aguilar-2007.pdf>.

VELÁSQUEZ, J. (1982). Deshidratación aguda por diarreas. En: Urgencias en Pediatría 3a ed. México, DF. Ediciones Médicas del Hospital Infantil México. Pp 258-63.

VICTORES, S.; CASTILLO, A.; FAIFE, E.; RABASA, Y.; RODRIGUEZ, Y.; ROJAS, L.; PALACIOS, J.; FIGUEREDO, A. (2008). Cultivos Semicontinuos como una Herramienta para la Caracterización Celular del Hibridoma murino 1E10. *Revista Científica Electrónica Biotecnología Aplicada*. Vol. 25. Nº 2. [consulta el 01/04/2018]. Pp: 149-154. Disponible en <http://elfoscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2008/25/2/BA002502TN1149-154.pdf>

VILLAR, J. (2017). Efecto del Tratamiento con Probióticos (*Saccharomyces boulardii*) sobre el Microbioma Intestinal y la Inflamación Sistémica en el paciente VIH virológicamente suprimido. Tesis de Medicina. Barcelona, España. 245 p.

VISAVET. CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA Y VETERINARIA. (2007). La Biotecnología en la Industria Alimentaria. [Artículo en línea]. Universidad Complutense. España. [consulta el 11/09/2012]. Disponible en <http://www.madrimasd.org/blogs/alimentacion/2007/04/25/64351>.

WANG, L. (1994). Adaptive Fuzzy Systems and Control, Englewood Cliffs NJ: Prentice-Hall. 232 p.

ZADEH, L. (1965). Fuzzy sets. *Information and Control* 8. Pp: 338-356.

ZADEH, L. (1975). L.A. Zadeh. The concept of a linguistic variable and its applications to approximate reasoning. Part ii. *Information Science* 8. Pp: 199-249.

ZANELLO, G.; MEURENS, F.; BERRI, M. (2009). *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr Issues Mol Biol.* Vol. 11, N°. 1. Pp: 47–58.

ZATARAIN, O. (2011). Lógica difusa. [Artículo en línea]. [consulta 16/04/2018]. Disponible en https://www.uaeh.edu.mx/docencia/P_Presentaciones/icbi/asignatura/logicaDifusa.pdf

**PLAN DE LA CALIDAD PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE
Saccharomyces boulardii.**

BREVE DESCRIPCION DEL PROCESO:

Las enfermedades diarreicas son la principal causa de defunción de niñas y niños menores de un año en América Latina (Dupont, 1996; Bass, 1996; Velásquez, 1981; Marcano, 1994; Gonzáles y Romero, 2002, Camaripano, 2007). Durante los primeros seis años de vida los niños son muy vulnerables a diferentes tipos de enfermedades, la diarrea es una de las más frecuentes de ellas (Velásquez, 1981), es por ello que los cultivos probióticos, como es el caso de la *Saccharomyces boulardii* inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y mejoran los mecanismos de defensa del tracto gastrointestinal (Rodríguez *et al.*, 2008).

Asimismo, se centrará la atención en el crecimiento de levaduras del género *Saccharomyces boulardii*, porque requieren sólo soluciones simples de nutrientes, pueden crecer a grandes velocidades, y son de gran utilidad, debido a que es una levadura probiótica con propiedades bioterapéuticas comprobadas, beneficiosa para la salud humana cuando se ingieren en concentraciones adecuadas (McFarland *et al.*, 1993; Ortiz *et al.*, 2008). La misma actúa como una flora temporal que protege el sistema intestinal y lo mantiene en buen funcionamiento.

Sobre la base de lo anterior y considerando las grandes ventajas que ofrece este tipo de microorganismo resulta de gran utilidad la elaboración de un documento a través del que se detalle cómo debe ser el proceso que garantice la calidad de la levadura *Saccharomyces boulardii*, así como los recursos que serán necesarios o quienes serán los encargados de aplicar el plan.

En este propósito a continuación se detallan los materiales y equipos necesarios para el proceso de producción de la levadura del género *Saccharomyces boulardii*:

APÉNDICE

Materiales de vidrio

- Fiola de 250ml y 1000 ml, 200ml.
- Beaker de 250ml, 1000 ml.
- Tubos de prueba de 15x 150mm.
- Termómetros de vidrio.
- Embudos.
- Pipetas de 1ml, 25ml.
- Celdas de vidrio para el Espectronic 20 D.
- Cilindros graduado 10ml, 50ml, 250ml.
- Frascos para diluyentes con capacidad de 350 ml.
- Matraz de 250 ml, 500 ml y 1000ml.
- Placas de Petri (100 x 15 mm).
- Bureta de 50 ml y precisión 0.1 ml.
- Varillas de vidrio.
- Vasos de precipitado.
- Recipiente del biorreactor.

Equipos

APÉNDICE

- Autoclave.
- Balanza digital de capacidad 150gr máximo, con sensibilidad 0,1gr.
- Balanza digital de capacidad 350gr máximo, con sensibilidad 0,1gr.
- Baño de agua para templar y mantener el medio fundido a 40- 100°C.
- Biorreactor.
- Campana de siembra de flujo laminar.
- Centrifuga.
- Contador de colonias digital y manual.
- Estufa de incubación 35 – 37 °C.
- Microscopio.
- Nevera.
- Plancha de Calentamiento.
- Pro pipetas de 1-10ml.
- pH metro
- Refractómetro.

Medios de Cultivo.

- Agar POTATO DEXTROSA.

Otros:

APÉNDICE

- Ampicilina
- Vitamina B12
- Agua destilada.
- Agua Peptonada
- Alcohol 70% y propanol.
- Algodón.
- Aerosol anti bacterias.
- Bata de laboratorio.
- Cinta adhesiva.
- Envoplas.
- Fósforos.
- Gorro quirúrgico.
- Guantes quirúrgicos
- Gradilla.
- Magnetos
- Mecheros.
- Micro goteros.
- Morteros.

APÉNDICE

- Papel aluminio.
- Pizetas.
- Plancha eléctrica.
- Porta placas.
- Porta pipetas.
- Soportes universal.
- Tapa boca.
- Tijeras.

FORMATO (FPSM-025) DE PROCEDIMIENTO PARA SIEMBRA DE MICROORGANISMOS (LEVADURAS)

METODOLOGIA

El estudio se realizó con la utilización de un biorreactor modelo New Brunswick Scientific Co. INC, con capacidad de 2 litros, el cual consta de un suministro de aire (Cfm), agitación (Rpm) y sensor de temperatura (°C).

Los materiales biológicos, vegetales, reactivos y aditivos se acondicionaron de acuerdo a las concentraciones de fructosa para cada corrida y se agregaron en el recipiente del biorreactor para la producción de biomasa, donde se proporcionaron las condiciones optimas de crecimiento de la *Saccharomyces boulardii*. Se utilizaron las técnicas del laboratorio de microbiología de la UNELLEZ – SAN CARLOS, y lo establecido en las normas COVENIN 1337-90. Se procedió a preparar los medios de cultivo necesario para la siembra en las placas de la levadura en estudio *Saccharomyces boulardii*.

APÉNDICE

- **Preparación de Agar.**

El Agar utilizado para la siembra fue el Agar potato dextrosa, el cual es un medio utilizado solo para el crecimiento de levaduras y moho; dicho medio cuenta con especificaciones de preparación de la casa comercial donde se indica que se deben agregar 39 gr de Agar por cada 1000 ml de agua para su preparación.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se preparo la cantidad de Agar a utilizar para cada proceso, tomando en cuenta que se necesitaban 144 placas de Petri a las que se les adiciono 15 ml de Agar diluido para cada una, por lo que se necesito un volumen total de Agar (2160). Por lo tanto se calcularon los gramos de Agar a utilizar de la siguiente forma:

$$\begin{array}{rcl} 39 \text{ gr de Agar} & \longrightarrow & 1000 \text{ ml} \\ x & \longleftarrow & 2160 \text{ ml} \\ x = 86,3 \text{ gr de Agar} \end{array}$$

Una vez pesado el agar se diluyó en el volumen de agua necesaria, utilizando dos fiolas de 2000 ml, inmediatamente se procedió a su calentamiento con la ayuda de un mechero Bunsen agitando frecuentemente hasta obtener una apariencia cristalina de la misma.

Después de dicha preparación se envasaron en frasco de vidrio con tapas, cada uno con 100 ml, utilizando 21 frascos, los que fueron esterilizados en el autoclave a 121° C y 15 lb de presión, por 15 minutos. Luego de terminar dicho proceso el medio se enfría hasta una temperatura aproximada de 45 – 50° C, con el fin de agregar 10 gotas de ácido tartárico por cada 100 ml de agar, debido a que se debe acondicionar el medio de cultivo para la determinación de la levadura a un pH de 3.5 – 4.0 ya que el mismo que es utilizado del cultivo de levadura y moho. Luego de acondicionar y homogenizar cuidadosamente se verso acéticamente el mismo en las placas de Petri.

APÉNDICE

- **Preparación del agua peptonada.**

Para la preparación de este medio se utilizó una concentración de 0.1 % (0.1 gr / 100 ml) de acuerdo a lo establecido en la norma COVENIN 1337 – 90.

Para cada proceso se requiere preparar el agua peptonada necesaria para un total de 36 frascos de vidrio con tapas con 90 ml para los 36 frascos y otro 12 frascos de vidrio con tapas con 180 ml para cada uno. Lo que indica que se necesitó (5400 ml) para esto se realizaron los cálculos de la siguiente forma:

Frasco con 90 ml

$$\begin{array}{rcl} 0,1 \text{ peptonas} & \longrightarrow & 100 \text{ ml} \\ X & \longleftarrow & 2160 \text{ ml} \\ x = 2.2 \text{ gr} \end{array}$$

De esta manera el mismo cálculo para el frasco de 180 ml.

Una vez pesada la cantidad de peptona a utilizar y medido el volumen de agua necesaria se disolvió la misma en un dos frascos de 2000 ml una que corresponde a los frascos de 90 ml y otra para los de 180 y se agregó en los frascos de vidrio con tapas en la cantidad correspondiente para su posterior esterilización.

- **Preparación del sustrato (lactosuero)**

El lactosuero para la producción de biomasa de *Saccharomyces boulardii* fue envasado en frascos de 250 ml con tapas, posteriormente se esterilizó a 121 ° C por 15 min a 15 lb de presión. Por último se adicionó (300mg /1500lt), 1 gr de ampicilina, 1 gr de vitamina B12, 1 gr vitamina A y 256 gr de fructosa al 25 %.

APÉNDICE

Se prepararon diluciones de diferentes concentraciones de fructosa (15, 25, 35 %) con el objetivo de darle respuesta a la investigación.

- **Preparación del Inoculo (Pie de cubo)**

Consiste en el acondicionamiento de la levadura para luego ser agregada al biorreactor, con el fin de activar las células de las mismas, adaptándolas a las condiciones del sustrato se inoculo a través del cultivo puro de (*Saccharomyces boulardii*) en 250 ml del sustrato (suero de leche previamente esterilizado), se incubó por 30 min, y una vez activada se agregó al biorreactor bajo las siguientes condiciones 200Rpm, temperatura de 30 ° C, aireación de 2 pie³. Luego se procedió de la siguiente manera:

- Se tomo 250 ml del total del sustrato en una fiola.
- Se agrego los 8 gr de levadura al sustrato (suero de leche)
- Se tapo la boca de la fiola con algodón, para así filtrar el aire que penetra en la botella, tomando en cuenta que la levadura requiere de la presencia de oxígeno para activarse.
- Por último, se dejó reposar a una temperatura de 30° C y se observó constantemente hasta que se forme una cantidad suficiente de burbujas; esto indica que la levadura se ha activado lo suficiente y que está en capacidad de actuar sobre el sustrato.

Proceso biotecnológico (fermentación semicontinua)

- Preparado los medios de cultivo y la concentración de lactosuero debidamente esterilizado, y todo el material de vidrio a utilizar se da inicio al proceso de fermentación, en los siguientes pasos:

APÉNDICE

- Agregar el sustrato al recipiente de vidrio estéril del biorreactor, separando 1500 ml del volumen total del sustrato para la preparación del inóculo.
- Se enciende del equipo, con el fin de estabilizar la temperatura (valor experimental), pH (4.5 a 5), agitación (valor experimental) y aireación ($2 \text{ pie}^3/\text{min}$) óptimos para el crecimiento y desarrollo de la levadura (*Saccharomyces boulardii*).
- Una vez activada la levadura y estabilizada las condiciones del biorreactor, se incorpora el inóculo al sustrato.
- Al iniciarse el proceso se miden los °Brix de inicio y se procede a la toma de las muestras, las cuales son realizadas en intervalos de tiempo de 1 hora, desde la hora de inicio (h_0) hasta la hora final (h_{12}). Esta toma de muestra consiste en extraer 20 ml del sustrato lactosuero inoculado con una pipeta estéril y agregarlo en un frasco con 180 ml de agua peptonada y de esta manera se obtiene la dilución 10^{-1} se homogeniza. Posteriormente se preparó la dilución 10^{-3} , tomando 1 ml de la dilución anterior para añadirlo en un frasco con 90 ml de agua peptonada previamente preparada y esterilizada. De igual manera se continúan preparando las diluciones 10^{-5} , 10^{-7} .
- Después de preparar todas las diluciones por triplicado se comienza con la siembra en placas de Petri, la misma se realizó en superficie y consistió en agregar 0.1 ml de la dilución correspondiente y con una varilla angular de vidrio estéril, se distribuye uniformemente el inóculo sobre la superficie del
- agar. La siembra se realizó en el siguiente orden: 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} , 10^{-1} y por triplicado.
- Finalmente se incuban las placas en una estufa de incubación a 30°C por 5 días.

APÉNDICE

Recuento en Placas

Es una técnica utilizada para estimar las unidades formadoras de colonias (ufc) presentes en una muestra. El recuento se realizó con la ayuda de un contador de colonia digital. Las unidades formadoras de colonia presente en la muestra se determinan mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$Ufc = N^{\circ} C * \frac{1..}{Dilc} * 10$$

FORMATO DE DISTRIBUCION DEL PERSONAL (FDP-010)

ORGANIGRAMA DE LA EMPRESA

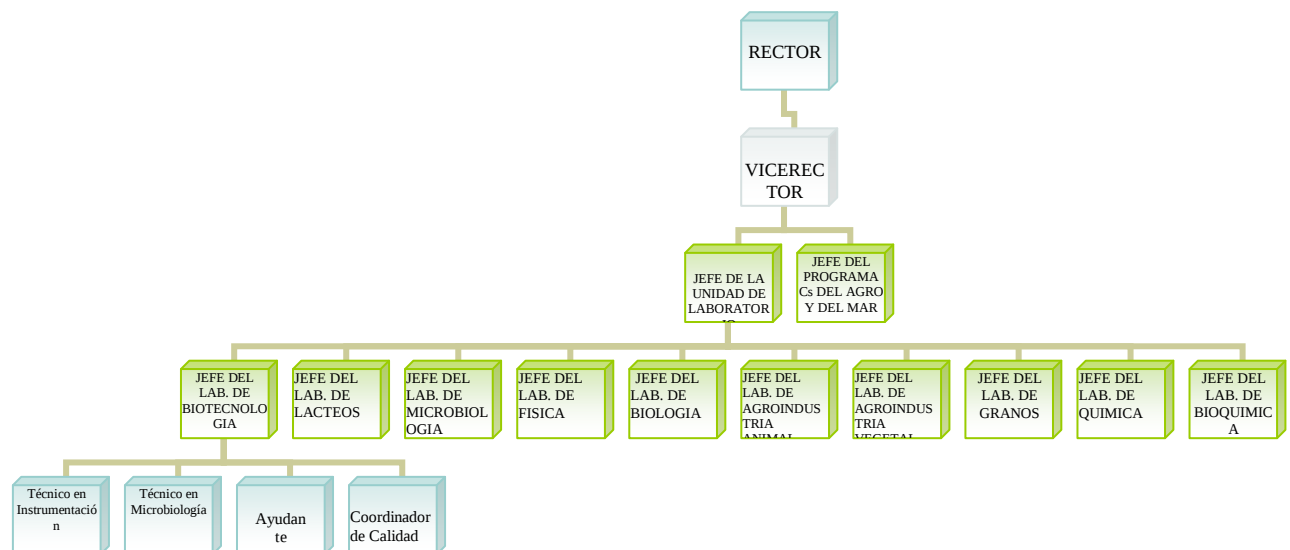


Figura 1. Organigrama de la Unellez

DIAGRAMA DEL SISTEMA

En la investigación a desarrollar solo se realizará el plan de calidad para el proceso experimental de producción de *Saccharomyces boulardii* (producción en laboratorio), de manera que la lógica difusa será la forma de validación de los resultados.

Entradas

Materia Prima: Sustrato, Microorganismos, vitaminas, minerales.

Mano de Obra: Jefe del Laboratorio de Biotecnología, Técnico en Instrumentación, Técnico en Microbiología, Coordinador de Calidad, Ayudante.

Recursos

Materiales y Equipos: Material de vidriería, placas de Petri, buretas, biorreactor, medidores de pH, temperatura, rpm, contadores de placas, cámaras de sembrado, neveras, microscopios, balanzas, autoclave.

Proceso

Producción de *Saccharomyces boulardii*.

Salida

Biomasa de *Saccharomyces boulardii* (masa húmeda) y desperdicios.

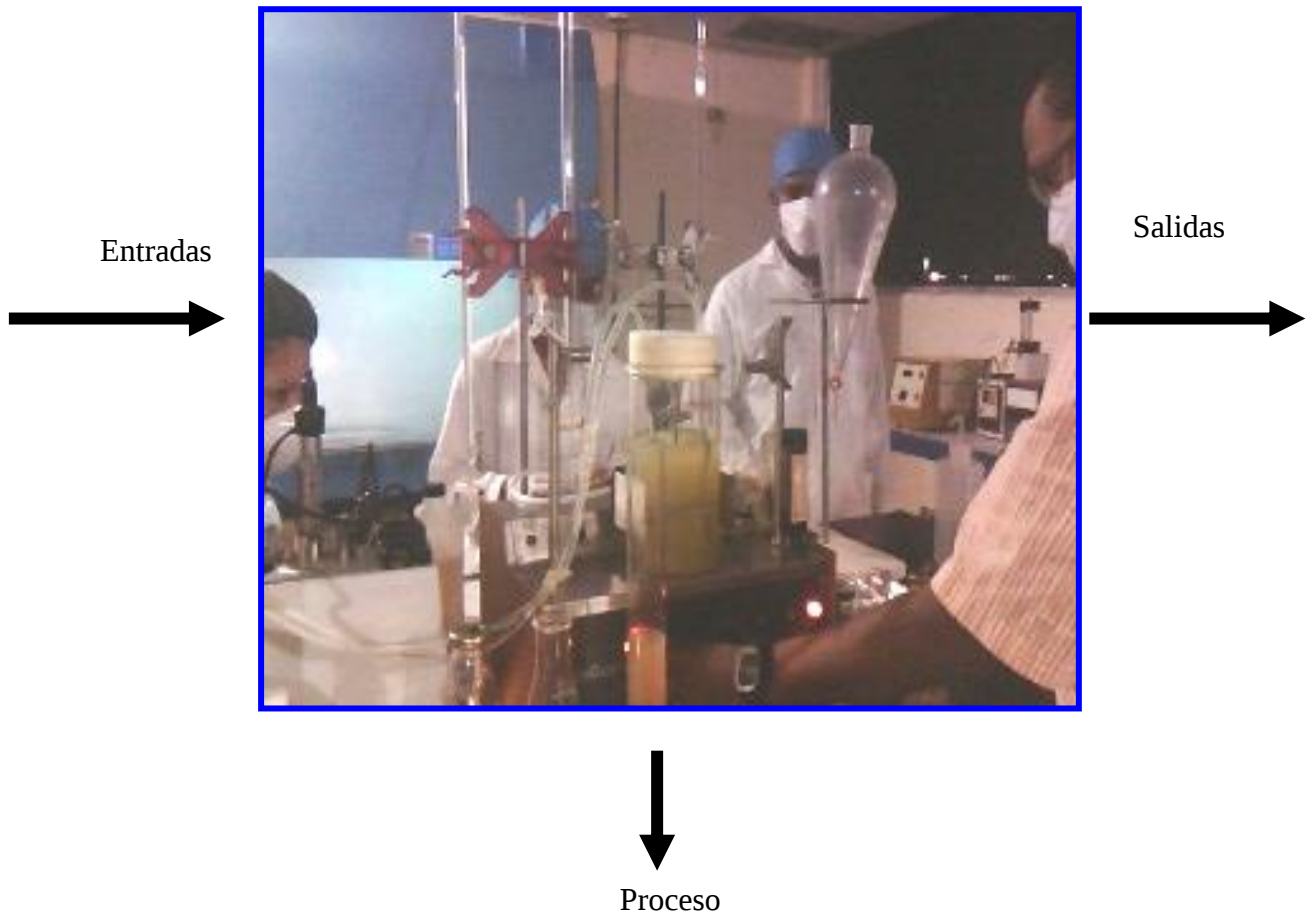


Figura 2. Diagrama del Sistema para la Producción de *Saccharomyces boulardii*

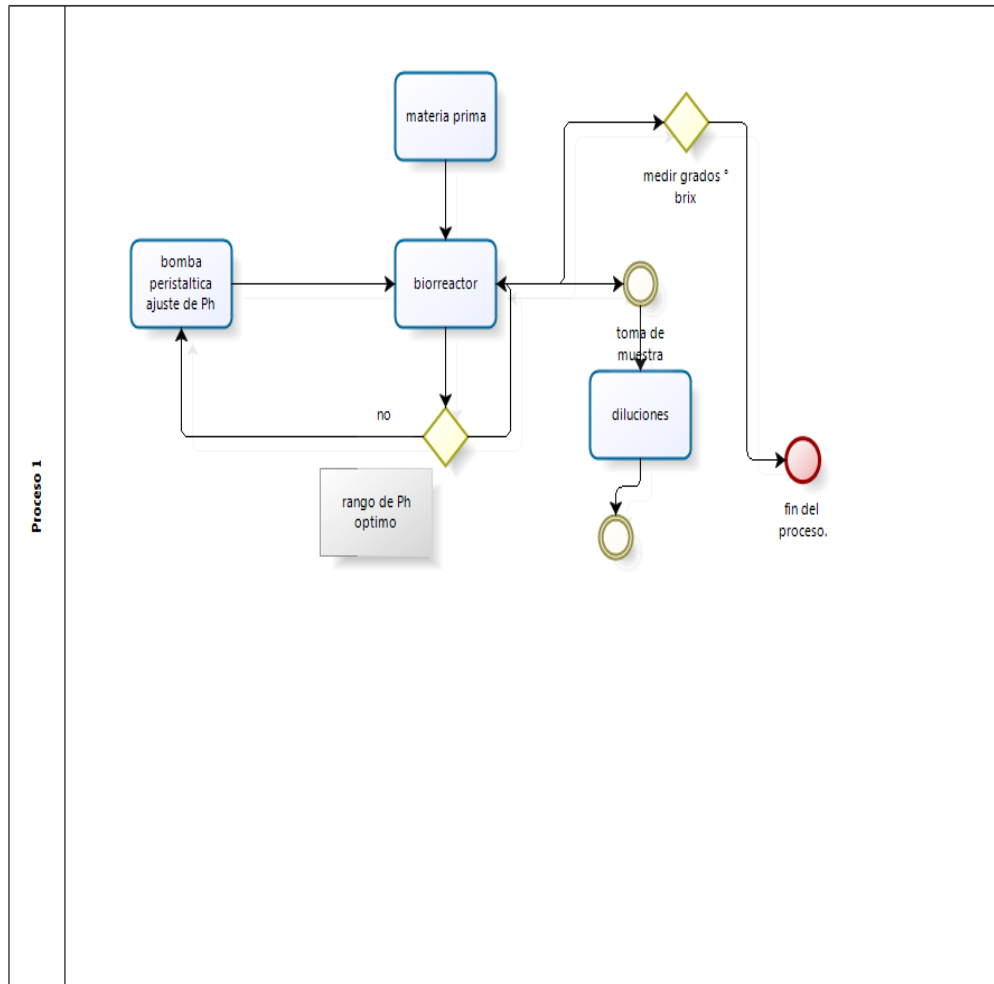


Figura 3. Diagrama tipo Esquema del Sistema para la Producción de *Saccharomyces boulardii*

GLOSARIO DE TERMINOS

Biomasa: f. Biol. Materia total de los seres que viven en un lugar determinado, expresada en peso por unidad de área o de volumen.

Biorreactor: recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos.

Cultivo semicontinuo: corresponde a un modo intermedio entre el cultivo por lote y continuo; frecuentemente se utiliza debido a sus posibilidades mejoradas de control.

Grados Brix: representa la densidad de la solución como porcentaje del peso. En el caso de las frutas y verduras que contienen sólidos disueltos otros a la sacarosa los BRIX representaran el porcentaje de estos en la solución.

Lactosuero: sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso.

Levadura: es un nombre genérico que agrupa a una variedad de células; entre ellas, diversos hongos microscópicos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la descomposición mediante fermentación de diversos cuerpos orgánicos, principalmente los azúcares o hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias.

Probiótico: son microorganismos vivos que, ingeridos en cantidades adecuadas, resultan beneficiosos para la salud o la fisiología humana, pues a medida que recorre el tracto gastrointestinal, la levadura genera efectos farmacodinámicos semejantes a los fisiológicos de la flora intestinal normalmente equilibrada.

***Saccharomyces boulardii*:** es una cepa de levadura tropical aislada por primera vez de las frutas del lichi y del mangostán en 1923 por el científico francés Henri Boulard. La misma ha probado ayudar a mantener y restaurar la flora intestinal natural en el intestino grueso y delgado y se le clasifica como probiótico.

APÉNDICE

LISTA DE FORMULARIOS CODIFICADOS

FPC: Formato del Plan de Calidad
CSP: Procedimiento del Sistema de Calidad
MCP: Manual de Contratación del Personal
FMP: Formato de recepción de materia prima
PMPS: Plan de Mantenimiento preventivo de Seguridad
PB2: Plan de Bioseguridad en Laboratorios Nivel 2
NI: Norma Interna de Limpieza
FPSM: Formato de Procedimiento para Siembra de Microorganismos (levaduras)
FDP: Formato de Distribución del Personal
FRM: Formato de Recuento de Microorganismos
FR: Formato de Requisitos
PNO: Procedimiento Normal de Operación
FEPL: Formato de Evaluación de los Proveedores del Laboratorio
FCI: Formato de Control de inventario
FIT: Formato de Instrucciones de Trabajo
FRP: Formato de Registro de Producto
PMPEL: Plan de Mantenimiento Preventivo de Equipos del Laboratorio
AS: Aseguramiento de la Calidad
FAG: Formato de Análisis de Gráficos
NIE: Norma Interna de Envasado
OPRH: Oficina de Personal y Recursos Humanos
UL: Unidad de Laboratorio
CM: Control de Materiales
BIO: Biotecnología
LB: Laboratorio de Biotecnología
UC: Unidad de Compras

Alcance del Plan de la Calidad para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces boulardii*.

Este plan se aplica a los procesos relacionados con la producción de biomasa de *Saccharomyces boulardii* utilizando lactosuero como sustrato. Este proceso forma parte del sistema de gestión de la calidad necesario para garantizar una flora intestinal estable y bien equilibrada, en lactantes y niños que presentan diarreas asociadas con rotavirus, adultos con diarrea aguda por el uso de antibióticos (garantizar satisfacción del cliente).

Política de la Calidad

Misión

Ofrecer un producto de excelente calidad que satisfaga las expectativas de nuestros clientes a fin de convertirnos en referencia de ámbito nacional e internacional aplicando en todas nuestras acciones la filosofía de mejora continua.

Contribuir con la preservación del medio ambiente a través de la utilización de materia prima proveniente de la manufactura del queso (lactosuero).

Visión

Liderar el área de la salud, siendo un referente de confianza para la sociedad, la comunidad científica y las instituciones públicas y privadas a nivel nacional e internacional como consecuencia de las implicaciones beneficiosas de la producción de biomasa de *Saccharomyces boulardii*, en enfermedades altamente prevalentes, como: la diarrea asociada con rotavirus en lactantes y niños, diarrea aguda por el uso de antibióticos en adultos, garantizando una flora intestinal estable y bien equilibrada que evite la colonización y el sobredesarrollo de microorganismos patógenos.

APÉNDICE

Contribuir de manera significativa a la generación de nuevos conocimientos en el área de medio ambiente evitando desechar el lactosuero (sustrato) como efluente y reduciendo así su impacto al suelo, a la flora y fauna acuática.

Objetivos de la Calidad

- ✓ Promocionar la importancia que desde el punto de vista de la salud tiene la producción de biomasa de *Saccharomyces boulardii*.
- ✓ Impulsar la mejora continua en busca de la excelencia.
- ✓ Desarrollar un sistema de calidad que fomente la utilización adecuada de los recursos (lactosuero) a fin de incrementar la productividad de la biomasa de *Saccharomyces boulardii*.

APÉNDICE

FPC-001	Producto/Línea de Producto: Biomasa de <i>Saccharomyces boulardii</i>	Originado por: Ing. Llelysmar Crespo	Aprobado por:	Rev: 01	08/12/2012
---------	--	--	---------------	---------	------------

Actividad	Descripción	Documento/ Procedimiento	Área/ Dpto.
Alcance	Este plan se aplica a los procesos relacionados con la producción de biomasa de <i>Saccharomyces boulardii</i> utilizando lactosuero como sustrato.		
Objetivos de la Calidad	Producción de biomasa en un tiempo menor a 15 horas. Rendimientos mayores al 90 %. Entregas a tiempo: una semana antes del inicio de cada semestre.		varios
Responsabilidades de la dirección	Es responsabilidad del Coordinador de Calidad: • Elaborar, actualizar, distribuir y controlar el presente procedimiento. • Elaborar, distribuir, controlar y actualizar los planes de calidad. • Verificar el cumplimiento de los lineamientos indicados en el plan de calidad. Es responsabilidad del Jefe del Laboratorio de Biotecnología: • Cumplir con todo lo especificado en el plan de calidad. • Participar en la elaboración del plan de calidad.	CSP-010 MCP-020	OPRH UL
Documentación	El jefe de la unidad de laboratorio LITA será el encargado de la recepción de la materia prima (lactosuero y cepa de <i>Saccharomyces boulardii</i>) y de distribuirla al área involucrada (laboratorio de biotecnología), el jefe del laboratorio de biotecnología será el encargado de realizar preparación de la materia prima y velara por la aprobación del documento para poder autorizar el proceso de producción de la biomasa. El instrumentista se encargará de registrar las variables químicas (pH, aireación, entre otras) durante el proceso tecnológico, el microbiólogo se encargará de realizar las siembras para cuantificar el crecimiento del microorganismo, el ayudante llevara el	FMP-010 FDP-010 CSP-020 Norma COVENIN	UL

	control de estos documentos en una carpeta disponible en el laboratorio de biotecnología. En el laboratorio se deben disponer de documentos como el de procedimientos normalizados de trabajo (PNT), los mismos contienen las instrucciones detalladas para la realización de un análisis microbiológico o procedimiento técnico.		
Registros	En los requerimientos los comentarios realizados por las áreas técnicas involucradas deberán estar registrados dentro del espacio establecido para ello en el formato. Las corridas o ensayos deberán ser registrados en su formato respectivo, él debe contener la cantidad de unidades formadoras de colonia por hora y los grados Brix, además el requisito en físico firmado se archivara en carpetas previamente identificadas. El requisito en físico deberá ser digitalizado y almacenado en una carpeta aparte en la unidad de laboratorio LITA. El laboratorio debe estar equipado con todo lo necesario en materia de seguridad de las instalaciones (extinción de incendios, señalización, protección, etc.). Se debe definir un plan específico de mantenimiento preventivo de los equipos de seguridad y mantener registros físicos de su cumplimiento.	CSP-025 PMPS-010 FRM-008	AS
Recursos	Se requiere que los materiales utilizados para el recuento de los microorganismos cumplan con lo establecido en la norma COVENIN 3123:1994 y la ISO-4833, lo que implica que los equipos que intervienen en la preparación de las muestras se rigen por la norma COVENIN 1126	NORMAS COVENIN 3123:1994, 1126, ISO- 4833.	UL
	Se requiere que todo el personal haya completado con éxito la formación sobre normas de bioseguridad en un laboratorio nivel 2 y que anualmente asista a congresos, reuniones, cursos o simposios que proporcionen actualización científica y técnica.	PB2-020	OPRH
	Se requieren equipos para siembra (cámara de sembrado) y conteo de microorganismos (Contador de Placas), así como equipos de medición de variables químicas (pH, grados Brix, aireación, entre otros) y un ambiente de trabajo aséptico, se deben cumplir con normas de esterilización y limpieza	NI-006 Normas COVENIN	UL

	del laboratorio	1126.	
Revisión de requisitos/Especificaciones del Cliente	Es requisito del plan cumplir con : • Rendimientos mayores al 90 %. • Entregas a tiempo: una semana antes del inicio de cada semestre. • Con las normas de bioseguridad en un laboratorio nivel 2, teniendo en cuenta especialmente el carácter potencialmente infeccioso de las muestras y de los reactivos empleados, sino se manipulan con precaución. Es requisito del plan manejar las normas COVENIN de Siembra y Recuento de Microorganismos. Por otra parte existe un formato (FR-011) para los requisitos específicos del producto (biomasa), el cual contiene aspectos que deben ser detallados por el solicitante: Fecha de la solicitud, fecha probable de entrega y prioridad, unidad solicitante, cantidad requerida, destino final del producto.	PB2-020 NORMAS COVENIN 3123:1994, 1126, ISO-4833. FR-011	AS
Comunicación con el cliente	La comunicación con el cliente se realiza de dos formas con la visita al sitio (otras unidades de laboratorio) por parte del Jefe del laboratorio de biotecnología o empleando el formato FCC-012, donde se plasman las observaciones con respecto al producto (calidad, tiempo de entrega, atención, entre otras), las mismas son digitalizadas y archivadas en carpetas para ser discutidas en reuniones mensuales.	FCC-012	LB
Diseño y desarrollo	El plan debe tener en cuenta las especificaciones del biorreactor como son: la temperatura (30° C), pH (4.5 a 5), agitación (200 rpm) y aireación (2 pie³/min), a fin de garantizar el crecimiento y desarrollo óptimo de la <i>Saccharomyces boulardii</i>. El plan debe garantizar la esterilización del lactosuero a 121 ° C por 15 min y a 15 lb de presión. Para el Recuento del microorganismo se incuban las placas en una estufa de incubación a 30° C por 5 días.	FPSM-025 PNO-025 COVENIN 3123:1994	LB
Compras	El plan contempla la evaluación a sus proveedores (formato FEPL-100)	FEPL-100	UC

	teniendo en cuenta el cumplimiento de los requisitos técnicos establecidos, plazos de entrega adecuados, garantía de calidad o rapidez de respuesta a ante problemas puntuales. Los proveedores aprobados se reevaluarán periódicamente para asegurar que mantienen la calidad de sus servicios. Por otra parte, el plan recoge la obligatoriedad de definir un sistema para el control de inventario de recursos y materia prima (agar para la siembra, reactivos, entre otros) necesarios para lograr la producción de <i>Sccharomyces boulardii</i> (FCI-150).	FCI-150	
Producción	La organización planificará y llevará a cabo la producción de biomasa de <i>Saccharomyces boulardii</i> bajo condiciones controladas. Las condiciones controladas deben incluir: el uso y mantenimiento apropiado de birreactor, cámaras de sembrado, autoclave, microscopios, entre otros., la disponibilidad de instrucciones de trabajo (formato FIT-020), normas de bioseguridad.	PNO-400 FIT-020 P020	UL
Identificación y trazabilidad	Para mantener la trazabilidad se establecerá un sistema de identificación de la materia prima, los recursos, entre otros, para ello se llevará un registro (formato FRP), donde se anotará el proveedor, producto y la fecha de entrada, lo que permitiría determinar los datos más relevantes de la fabricación del producto, las posibles incidencias en la fabricación, estancia en el laboratorio de un lote determinado de producto, etc., así mismo se levantará la información referente a los equipos birreactor, microscopios, neveras, autoclave, etc.	FRP-100 PNO-500 (PMPEL)	UL CM
Propiedad del cliente	Las especificaciones del cliente y los métodos de estandarización (ensayo/prueba) serán procesados y protegidos a través del sistema formal de especificación para conservar su integridad y asegurar la confidencialidad de la información ahí contenida	PNO-550	BIO
Almacenamiento y Manipulación	Los materiales comprados serán almacenados en estantes bajo la responsabilidad del Jefe de la Unidad de Laboratorio. La biomasa obtenida para el cliente en masa húmeda se refrigera y transporta en envases de plástico (norma interna de envasado), a fin de prevenir el daño, deterioro o contaminación del producto.	PNO- 490 NIE-028	CM

APÉNDICE

Productos no conformes	Se contempla que el producto no conforme se eliminará en el autoclave por ser un producto de procedencia biológica.	PNO-410	AS BIO
Seguimiento y medición	Se realizará un monitoreo de los grados Brix cada 5 min y una siembra para observar el crecimiento de <i>Saccharomyces boulardii</i> cada hora y se llevara un registro (formato FRM), a fin de analizar los resultados o información del proceso y registrar en gráficos.	FRM-008 FAG-100	AS
	Se realiza seguimiento a la satisfacción del cliente según lo establecido en el formato del PNO para tratamiento de reclamos y sugerencias que provengan del cliente.	PNO - 460	
Equipo de inspección y ensayo / prueba	El laboratorio cuenta con equipos de medición y ensayo/prueba (microscopios, termocupla, cámaras de sembrado, entre otros) para cubrir el alcance de sus actividades de desarrollo, producción, y control. Toda la calibración requerida se efectúa internamente o por el fabricante del equipo	PNO-470	AS
Auditoria	Se realizará una auditoria interna una vez al año que contemplara la revisión de manuales, procedimientos, normas de bioseguridad, registros, entre otros. Los registros de las auditorias se utilizaran para proporcionar evidencia de verificación, de acción preventiva y de acción correctiva logrando así, dar confianza a la dirección y a los clientes. Además las instalaciones pueden recibir auditorias del cliente y las reglamentarias.	PNO-450	AS

1	DIAGRAMA 1	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
1.1	PROCESO 1		164
1.1.1	Elementos del proceso		164
1.1.1.1	 solicitud de pedido/presupuesto		164
1.1.1.2	 chequear la caracterizacion del M.O que se esta solicitando		164
1.1.1.3	 definir especificaciones del cliente		164
1.1.1.4	 ¿se acepta el pedidp?		164
1.1.1.5	 compra de materia prima		164
1.1.1.6	 chequeo de materia prima segun normas internas		164
1.1.1.7	 seleccion de medio de cultivo		164
1.1.1.8	 diseño de plan para produccion		164
1.1.1.9	 preparacion de insumos a ulizar		164
1.1.1.10	 esterilizacion de material de vidrio		165
1.1.1.11	 pipetas		165
1.1.1.12	 plas de petri		165
1.1.1.13	 frascos de vidrio		165
1.1.1.14	 fiolas y beaker		165
1.1.1.15	 suatrato		165
1.1.1.16	 caracterizacion del suatrato		165
1.1.1.17	 analisis de plataforma		165
1.1.1.18	 esterilizacion del sustrato		165
1.1.1.19	 ajuste de grados °Brix		165
1.1.1.20	 esterilizacion de agar y caldo		165
1.1.1.21	 pesado de agar segun especificacion		165
1.1.1.22	 preparacion del bioreactor		165

1.1.1.23	 puesta en funcionamiento del bioreactor	165
1.1.1.24	 TOMA DE MUESTRAS	164
1.1.1.25	 TOMA DE MUESTRA PARA SIEMBRA	164
1.1.1.26	 siembra en placas	164
1.1.1.27	 colocacio en la estufa	164
1.1.1.28	 Contar placas y llevar el registro segun formato	164
1.1.1.29	 entrega de biomasa al cliente	164
1.1.1.30	 toma de muestras para °brix	164
1.1.1.31	 chequeo de °Brix	164
1.1.1.32	 parada de bioreactor	164
1.1.1.33	 se procede al filtrado para remover y aislar la biomasa	164
1.1.1.34	 presupuesto no aceptado	164
1.1.1.35	 Elemento	164
1.1.1.36	 embalaje y almacenamiento	166
1.1.1.37	 Elemento	166



PROCESO 1

ELEMENTOS DEL PROCESO



solicitud de pedido/presupuesto



chequear la caracterización del M.O que se está solicitando



definir especificaciones del cliente



¿se acepta el pedido?

Descripción

<p> </p>

Flujos

si

no



compra de materia prima



chequeo de materia prima según normas internas



selección de medio de cultivo



diseño de plan para producción



preparación de insumos a utilizar

☒ **esterilización de material de vidrio**

☒ **pipetas**

☒ **placas de Petri**

☒ **frascos de vidrio**

☒ **fiolas y beaker**

☒ **sustrato**

☐ **caracterización del sustrato**

☐ **análisis de plataforma**

☐ **esterilización del sustrato.**

☐ **ajuste de grados Brix**

☒ **esterilización de agar y caldo**

☐ **pesado de agar según especificación**

☐ **preparación del biorreactor**

☐ **puesta en funcionamiento del biorreact**

APÉNDICE



TOMA DE MUESTRAS



TOMA DE MUESTRA PARA SIEMBRA



siembra en placas



colocación en la estufa



contar placas y llevar el registro según formato



entrega de biomasa al cliente.



toma de muestras para °Brix



chequeo de °Brix

Flujos

si

no



parada de biorreactor



se procede al filtrado para remover y aislar la biomasa



presupuesto no aceptado



Elemento

APÉNDICE

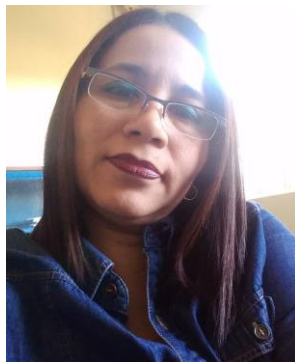


embalaje y almacenamiento



Elemento

Línea de Producto			Originado por: Ing. Llelysmar Crespo	Aprobado por:
FPC-001	Rev. 01	01 - 12 - 2012		



Lleylsmar Beatriz Crespo Durán, Profesora Asociado adscrita al Programa Ciencias del Agro y del Mar del Vice-Rectorado de Infraestructura y Procesos Industriales de la UNELLEZ-San Carlos, Cojedes-Venezuela. Cursó estudios de pre-grado en la UNEXPO Venezuela, recibió el título de Ingeniero Mecánico. Magíster *Scientiarum* en Ingeniería de Control de Procesos egresada de la UNEXPO Vicerrectorado Barquisimeto (2010). Doctora en Ciencias de la Ingeniería, mención Productividad de la UNEXPO, Barquisimeto Venezuela (2020). Es autora del libro: Sistema de Control Difuso en un Cultivo Semicontinuo de Levaduras. Modelado y Diseño, publicado por Editorial Académica Española, ha publicado más de 15 artículos científicos en revistas nacionales e internacionales en las áreas de Biotecnología y Control Automático de Procesos. Ha participado como Conferencista en importantes eventos académicos a nivel nacional e internacional. Investigadora PEII (NIVEL B). En la UNELLEZ ha desempeñado importantes cargos directivos: Coordinadora del Área de Postgrado, Jefe de subprograma, Jefe de la Unidad de Formación, Organización, Certificación y Registro Curricular, Delegada de CAPROF. Actualmente es Jefe del Programa Innovación Curricular y editora de la Revista Científica *Mangífera* del Vice-Rectorado de Infraestructura y Procesos Industriales de la UNELLEZ. Tutora y jurado evaluador de los programas de Maestrías y Doctorados impartidos en la UNELLEZ San Carlos.