

EFICIENCIA DEL *Garcinia madruno* COMO SUSTRATO EN LA PRODUCCIÓN EFECTIVA DE BIOMASA DE *Lactobacillus casei*



**UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL DE LOS LLANOS
OCCIDENTALES
EZEQUIEL ZAMORA**



UNELLEZ

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

Eficiencia del *Garcinia madruno* como sustrato en la producción efectiva de biomasa
de *Lactobacillus casei*

© Ing. Gabriel Cravo
Marzo de 2023

Reservados todos los derechos

ISBN: 978-980-248-329-7
Depósito Legal: CO2025000002

ISBN: 978-980-248-329-7



9 789802 483297

AUTORIDADES DE LA UNELLEZ

Dr. Adam Chávez
RECTOR DE LA UNELLEZ

Dra. María Fernanda Fernández
VICERRECTOR DE SERVICIOS

MSc. José Raúl Moreno
SECRETARIO GENERAL

Dra. Dilia 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. German Morales
DIRECCIÓN DE INNOVACIÓN CURRICULAR
Barinas, estado Barinas

MSc. Yelitza Roa
DIRECTORA DE CREACIÓN INTELECTUAL
Barinas, estado Barinas

Dra. Dilia González
DIRECTORA DE ESTUDIOS AVANZADOS
Barinas, estado Barinas

AUTORIDADES DE LA UNELLEZ / VIPI

**MSc. Tania Sandoval
VICERRECTOR DE AREA (E)**

**Dr. Robert Ardiles
JEFA DEL PROGRAMA DE ESTUDIOS AVANZADOS**

**MSc. Nakhary Mendoza
JEFA DEL PROGRAMA CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS**

**Dra. María Eugenia Paredes
JEFA DEL PROGRAMA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR**

**Dra. Yarith Navarro
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**

**Dra. Loreines González
SECRETARIA DEL CONSEJO ACADÉMICO**

DEDICATORIA

*A **Dios**, por darme las fuerzas y sabidurías.*

*A **Mi madre** que en la buenas y malas siempre está allí conmigo.*

*A **Mi Esposa**, por ser el brazo derecho de mi vida, esa mujer fuerte y servicial.*

*A **Mis hijas Valentina, Valeria y Victoria**, quienes son las bujías de mi vida.*

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
PRÓLOGO.....	1
 CAPÍTULO I: EL PROBLEMA.....	 4
Planteamiento del problema.....	4
Objetivos de la investigación	11
Objetivo General	11
Objetivos Específicos.....	11
Definición de las variables	12
Justificación e importancia.....	13
Alcances	16
 CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	 18
Antecedentes	18
Bases Teóricas.....	24
Madroño.....	24
Características morfológicas.....	25
<i>Garcinia Madruno</i>	26
Características químicas del fruto en Bolivia.....	28
Atributos farmacológicos.....	29
Especies relacionadas.....	30
<i>Lactobacillus</i>	30
<i>Lactobacillus casei</i>	32
Ciclo de Crecimiento de Cultivos Microbianos	36
Sustrato.....	37

Biorreactor.....	38
Clasificación de los biorreactores	39
Factores ambientales que afectan el crecimiento	41
Medio de Cultivo	42
Componentes de un Medio de Cultivo.....	43
M.R.S. Agar	44
M.R.S. Caldo.....	45
Análisis envolvente de datos.....	45
 CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	 49
Enfoque Epistemológico	49
Tipo y diseño de la investigación.....	50
Tipo de investigación	50
Diseño de la investigación	51
Unidad de investigación, población y muestra	55
Unidad de investigación.....	55
Población.....	55
Muestra.....	56
Técnicas e instrumentos recolección de datos	56
Validez y confiabilidad de los instrumentos	58
Validez	58
Confiabilidad.....	59
Técnicas de procesamiento y análisis de la información	59
Procedimiento	60
 CAPÍTULO IV: RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	 76
Resultados de la investigación	76
Caracterización física, química y microbiológica del sustrato <i>Garcinia madruno</i> . 76	
Diseño de arreglo de tratamientos óptimos de hipercubo latino escalable para el proceso de producción de <i>Lactobacillus casei</i>	79

Optimización vía simulación las condiciones operativas del proceso de producción del <i>Lactobacillus casei</i> empleando como sustrato <i>Garcinia madruno</i>	88
Determinación de la eficiencia productiva empleando el método no paramétrico DEA (Data envelopment analysis).....	99
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	104
CONCLUSIONES	104
RECOMENDACIONES.....	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
ANEXOS	119

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Representación esquemática: Abordaje del problema.....	10
FIGURA 2. Caracteres diagnósticos de <i>Garcinia madruno</i> , hojas, peciòlos, flores y frutos.....	27
FIGURA 3. Frutos en drupa con epicarpio rugoso.....	28
FIGURA 4. Curva de crecimiento microbiano	36
FIGURA 5. Biorreactor y sistemas auxiliares.....	66
FIGURA 6. Flujograma de obtención de biomasa.....	67
FIGURA 7. Flujograma para la obtención de la pulpa de <i>Garcinia madruno</i>	70
FIGURA 8. Concentración de biomasa de <i>Lactobacillus casei</i> (ufc/ml) con <i>garcinia madruno</i> vs. Tiempo (h) para los tratamientos 1, 3, 9 y 16.....	81
FIGURA 9. Concentración de biomasa de <i>Lactobacillus casei</i> (ufc/ml) con <i>garcinia madruno</i> vs. Tiempo (h) para los tratamientos 12, 22, 27 y 28.....	82
FIGURA 10. Concentración de Biomasa de <i>Lactobacillus casei</i> (Ufc/ml) con <i>Garcinia madruno</i> vs. Tiempo (h) para los tratamientos 18, 19, 20 y 23.....	83
FIGURA 11. Concentración de Biomasa de <i>Lactobacillus casei</i> (Ufc/ml) con <i>Garcinia madruno</i> vs. Tiempo (h) para los tratamientos 5, 11, 14 y 17.....	84
FIGURA 12. Concentración de biomasa de <i>Lactobacillus casei</i> (ufc/ml) con <i>garcinia madruno</i> vs. Tiempo (h) para los tratamientos 4, 8, 24 y 26.....	85
FIGURA 13. Concentración de biomasa de <i>Lactobacillus casei</i> (ufc/ml) con <i>garcinia madruno</i> vs. Tiempo (h) para los tratamientos 2, 6, 10 y 15.....	86
FIGURA 14. Concentración de Biomasa de <i>Lactobacillus casei</i> (Ufc/ml) con <i>Garcinia madruno</i> vs. Tiempo (h) para los tratamientos 7, 13, 21 y 25.....	87
FIGURA 15. Contraste para la respuesta Y_1 : Concentración de biomasa.....	90
FIGURA 16. Contraste para la respuesta y_2 : Concentración de etanol.....	91
FIGURA 17. Contraste para la respuesta y_3 : Sólidos solubles totales.....	92
FIGURA 18. Modelo para la respuesta Y_1 : Concentración de biomasa	93
FIGURA 19. Modelo para la respuesta Y_2 : Concentración de etanol	93

FIGURA 20. Modelo para la respuesta y_3 : sólidos solubles totales.....	94
FIGURA 21. Valores medidos vs valores predichos, para la visualización de la bondad de ajuste del modelo para biomasa bajo diseño hipercubo latino	95
FIGURA 22. Valores medidos vs valores predichos, para la visualización de la bondad de ajuste del modelo para etanol bajo diseño Hipercubo Latino	96
FIGURA 23. Valores medidos vs valores predichos, para la visualización de la bondad de ajuste del modelo para sólidos totales bajo diseño Hipercubo Latino	97
FIGURA 24. Optimización operativa bajo el diseño hipercubo latino.....	98
FIGURA 25. Diagrama de procesos del sistema simulado	100
FIGURA 26. Comparación de la eficiencia para los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.....	101
FIGURA 27. Comparación de la Eficiencia para los tratamientos 13, 14,15,16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24.....	101
FIGURA 28. Comparación de la eficiencia para los tratamientos 25, 26, 27 y 28	102
FIGURA 29. Comparación de la Eficiencia para los tratamientos 2, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 18, 20, 23 y 26.....	102
FIGURA 30. Rendimiento de biomasa (ufc/ml) en función del sustrato (%)... ..	103

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Características fotoquímicas de la pulpa del madroño según su procedencia	9
TABLA 2. Definición conceptual y operacional de las variable.....	12
TABLA 3. Características químicas del <i>Garcinia madruno</i> de Bolivia.....	29
TABLA 4. Géneros de las Bacterias ácido Lácticas.....	32
TABLA 5. Contenido y composición del caldo M.R.S.....	45
TABLA 6. Modelos DEA.....	47
TABLA 7. Valores de K0.....	48
TABLA 8. Niveles (variables de entrada) para los factores experimentales.....	53
TABLA 9. Matriz “D” de diseños de tratamientos.....	54
TABLA 10. Materiales de vidrio.....	64
TABLA 11. Equipos empleados en el proceso de producción de <i>lactobacillus casei</i>	65
TABLA 12. Medios de cultivo	66
TABLA 13. Materiales para preparación de agar.....	68
TABLA 14. Materiales para preparación de caldo.....	69
TABLA 15. Caracterización química y microbiológica de la pulpa de <i>garcinia madruno</i>	77
TABLA 16. Matriz de diseño de tratamientos y respuestas tecnológicas.....	80

PROLOGO

En la actualidad se han incrementado los esfuerzos destinados a la investigación en el área de producción de compuestos de uso común, lo que ha generado un conjunto de innovaciones tecnológicas que se basan en la utilización de microorganismos y procesos microbiológicos para la obtención de bienes y servicios (CIBIOGEN, 2008) y que apuntan al desarrollo de la biotecnología, área multidisciplinar que emplea sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados para crear productos o procesos de usos específicos, que permitan obtener altos rendimientos con menos recursos, al utilizar sustratos de muy bajo costo que proporcionen las condiciones adecuadas para generar productos a servicios de interés biotecnológico e industrial (CBUC, 2013; Panesso *et al.*, 2015).

Con referencia a lo anterior, un sustrato representa el material que contiene una adecuada combinación de nutrientes, además de ser rico en azúcares fermentables que colaboran en el crecimiento o el incremento del número de células de una población microbiana (De Aulacio *et al.*; 2008), como las de *Lactobacillus casei*.

En ese sentido esta investigación pretende otorgarle un mejor aprovechamiento a un fruto de origen silvestre como el *Garcinia madruno*, poco explotado a nivel industrial (Chavez, 2012), con gran cantidad de nutrientes que son fácilmente utilizables por microorganismos como el *Lactobacillus casei*, de tal forma que sintetizan las macromoléculas y conservan los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas para garantizar su desarrollo (Junco y Rodríguez, 2001).

En lo que respecta a este microorganismo, es una especie de gran importancia que ofrece grandes beneficios al ser humano al equilibrar la microflora intestinal, prevenir los trastornos intestinales, regular el sistema inmune específicamente de la respuesta inmune celular (Todd y Martin, 1999; Velásquez *et al.*, 2015) y ejercer una potente acción sobre enfermedades comunes como las evacuaciones líquidas

infantiles (Dubey *et al.*, 2008), las asociadas con antibióticos (Hempel *et al.*, 2012) y las del viajero (Sánchez *et al.*, 2015), intolerancia a la lactosa (Montalto *et al.*; 2006), entre otras.

Sobre la base de las consideraciones anteriores a través de la presente investigación se busca determinar la eficiencia del *Garcinia madruno* como sustrato en la producción efectiva de biomasa de *Lactobacillus casei*.

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, su formulación, objetivos generales y específicos, justificación, y los alcances y limitaciones de la investigación.

Capítulo II, Marco Teórico. En este capítulo se presenta la información basada en trabajos previos relacionado con la investigación, artículos de revistas, entre otros, que proporcionan 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. En este apartado de la investigación se presentan los resultados y la discusión de los mismos a fin de validar el estudio.

Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones: Este capítulo sintetiza las consideraciones más importantes que dan respuesta a los objetivos planteados.

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

EL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los microorganismos han sido investigados activamente a nivel mundial desde tiempos inmemoriales, debido a sus efectos benéficos para la salud, la agricultura, la industria alimentaria, entre otros campos (García, 2018) y Venezuela no escapa de esa realidad, por el contrario hace un énfasis particular en su estudio con fines farmacéuticos, específicamente en el área de probióticos, donde estos microorganismos vivos actúan disminuyendo las enfermedades de tipo gastrointestinal (CONVITE, 2018), que desencadenan cuadros patológicos importantes en humanos como: gastritis, evacuaciones líquidas, colon irritable e incluso cáncer.

Con referencia a lo anterior, la desnutrición y las enfermedades gastrointestinales son dos de las principales causas de muerte infantil en el mundo. Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó que cerca del 22 por ciento de las defunciones anuales de niños menores de cinco años son causadas por evacuación líquida crónica y enfermedades gastrointestinales, particularmente en países en vías de desarrollo (Balam *et al.*, 2002 y Forsberg *et al.*, 2007). La medicina tradicional y moderna hace del uso de alimentos fermentados como una alternativa para la prevención y tratamiento de estos y otros padecimientos (González *et al.*, 2008; Holzapfel, 2002; Vandenplas *et al.*, 2002), ya que su consumo proporciona una ruta de entrada común para agentes biológicos que conforman la flora intestinal benéfica, este tipo de microorganismos son conocidos como agentes probióticos (Argüelles *et al.*, 2000 y Fitzgerald *et al.*, 2006)

En ese sentido estudios han demostrado que una de las soluciones menos agresivas y más efectivas a este tipo de patologías recae en el consumo de productos que contengan probióticos, esto se debe a que dichos microorganismos tienen la habilidad de reconstruir la flora intestinal mejorando así el proceso de digestión

(James *et al.*, 2017), expresando de esta manera su importante aplicabilidad en la industria farmacéutica, de alimentos, entre otras (Tomasini, 2011).

En este propósito, los probióticos son definidos como microorganismos vivos presentes en los alimentos los cuales al ser ingeridos, en cantidades suficientes, pueden ejercer una actividad fisiológica específica, beneficiando a la salud del individuo (Ramírez *et al.*; 2011). Así, un alimento que contiene especies probióticas es capaz de proteger al individuo de diferentes maneras:

- 1) Compitiendo por espacio físico y nutrientes.
- 2) Produciendo sustancias antibióticas (bacteriocinas) activas frente a patógenos.
- 3) Estimulando el sistema inmune del intestino y contribuyendo a la acidificación de contenido del colon, lo cual es desfavorable para el crecimiento de patógenos (Roberfroid, 2000).

El *Lactobacillus casei* es un microorganismo considerado de tipo probiótico, muy eficaz para equilibrar la microflora intestinal y prevenir los trastornos intestinales, es productor de ácido láctico que se emplea también en la industria láctea y que es capaz de regular el sistema inmune, específicamente de la respuesta inmune celular (Velásquez *et al.*, 2015). Asimismo, esta especie de lactobacilo es particularmente resistente a rangos amplios de pH (Yuki *et al.*, 1999; Brink y Todorov, 2006). Adicionalmente, se ha referido que *Lactobacillus casei* mejora la capacidad de digestión, la tolerancia a la leche y evita las evacuaciones líquidas (Isolauri, 1991; Manzano, 2012). Una larga lista de contribuciones ha documentado las propiedades funcionales probióticas de *Lactobacillus casei*: efecto antimicrobiano (Brink y Todorov, 2006), disminución de los niveles de colesterol y de las evacuaciones líquidas por infecciones gastrointestinales y coadyuvante en la digestión de la lactosa.

Como puede observarse, los beneficios que aporta la producción de *Lactobacillus casei*, son indiscutibles al mejorar la flora intestinal humana y de los animales, y juega un papel importante en el estado de salud y en la presencia de enfermedades (Ramírez *et al.*, 2011), registrando ventajas que despiertan el interés en su reproducción.

En relación con el punto anterior, se necesita que ciertas variables (tales como concentración de nutrientes, pH y temperatura) sean cuidadosamente mantenidas en valores específicos o rangos pre-establecidos, denotando de esta forma el importante papel que desempeña el uso de un biorreactor en el cultivo de microorganismos. Este dispositivo biotecnológico (recipiente o sistema) mantiene un ambiente biológicamente activo (Hemson, 2006), es decir que provee internamente un ambiente controlado que garantiza y maximiza la producción o crecimiento de un cultivo vivo, al establecer una frontera que protege el cultivo del ambiente externo: contaminado y no controlado. Se corresponde con los sistemas multivariables, debido a que durante su operación, sustratos son consumidos, productos y metabolitos intermediarios son generados en presencia de células vivas con alto rendimiento (productividad) y en el menor tiempo posible (Sánchez, 2015).

Resulta oportuno establecer el modo de operación del biorreactor, debido a que éste define el sistema de cultivo y delimita la clasificación procesal-productiva del bioproceso (cultivo); en atención a ello, los biorreactores se clasifican, de acuerdo al modo de operación, en discontinuo, semicontinuo y continuo, lo que permite que automáticamente quede determinado el modo de cultivo al mismo tiempo que se definen los parámetros, las características operativas y de diseño que intervienen en el proceso productivo del sistema (Escalada, 2010).

En lo que se refiere al modo de cultivo semicontinuo, Cravo (2012) evaluó el crecimiento en un proceso biotecnológico de cultivo para producción a escala de laboratorio de cepas de la especie *Lactobacillus casei*, permitiendo afirmar que este tipo de proceso es el más apropiado, debido a que la alimentación del cultivo se inicia

cuando el sustrato limitante se ha agotado controlando de esta forma la velocidad de crecimiento, regulando la velocidad de alimentación (caudal); para ello se debe alimentar el cultivo con medio fresco, a fin de que el sistema de cultivo tenga un producto (biomasa) con máximo crecimiento (exponencial) y aumente la productividad.

En relación con esto último, se debe tener presente que los microorganismos, aunque son los seres vivos más abundantes de la tierra, y pueden vivir en condiciones extremas de pH, temperatura, tensión de oxígeno, colonizando una amplia diversidad de nichos ecológicos, no solo necesitan de un ambiente controlado que garantice y maximice la producción o crecimiento del cultivo, sino que requieren de aportes nutricionales importantes para su desarrollo, entre los que se encuentran el carbono, el oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno. En el caso de los lactobacilos, presentan particularidades para cada especie como aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Generalmente estos requerimientos suelen suplirse con el medio de cultivo (Panesso, 2015); asimismo, necesitan de micronutrientes como el manganeso, el cual funciona como cofactor y sirve de estructura para varias enzimas, como es el caso de la enzima lactosa deshidrogenasa (Madigan *et al*, 2004).

Ante la situación planteada, los medios de cultivo o sustratos naturales, sintéticos o semisintéticos representan la alternativa que permite suplir dichos requerimientos (López y Torres, 2006); en el caso de *Lactobacillus casei*, a nivel industrial, se utiliza una solución de nutrientes compleja, comercialmente denominada caldo de MRS (Man Rogosa Sharpe), la que se considera un medio de cultivo específico para el crecimiento de lactobacilos, porque contiene macro y microelementos, tales como extracto enzimáticamente digerido de carne y concentraciones de sales como el citrato de amonio. Sin embargo, aunque contiene la composición apropiada para la producción de los lactobacilos, el medio MRS no

resulta rentable debido a su alto costo, y para ilustrar esta desventaja algunos autores establecen una comparación sencilla: 500 g del medio MRS tienen un valor aproximado en el mercado de 108,46 USD, y la elaboración de un litro de este medio comercial es de 14,02 USD (Jurado, 2009; Jurado *et al.*, 2014) y si se considera que el costo de los nutrientes representa entre el 10 y 60 por ciento del costo total de muchos productos obtenidos por fermentación (OCT, 2006) y que la disponibilidad del mismo en el mercado venezolano cada vez es más estrecha por el tema de las importaciones, se hace prioritario disminuir el costo de los medios de cultivo para este microorganismo.

Es evidente entonces que existe un marcado interés en la búsqueda de nuevos sustratos o medios de cultivo para el desarrollo del microorganismo (León *et al.*, 2013), que puedan cumplir con la composición nutricional, con la economía (Junco y Rodríguez, 2001) y al mismo tiempo coloquen de manifiesto el criterio de eficiencia, que se asocia a la capacidad para seleccionar y usar los insumos (sustratos) más efectivos y de menor desperdicio con el fin de llevar a cabo una tarea o lograr un propósito (producción de *Lactobacillus casei*) (Mokate, 1999). En ese sentido, los residuos orgánicos, los subproductos de la agroindustria, las sustancias de origen animal y vegetal que resulten de fácil adquisición, proporcionen un buen desarrollo y una elevada producción, se vislumbran como la mejor elección (Arévalo *et al.*, 2017).

Hecha la observación anterior, la evaluación de la eficiencia de sustratos no convencionales como es el caso del *Garcinia madruno*, permite otorgarle un buen aprovechamiento a un producto de origen vegetal, de fácil acceso, que se distribuye desde América Central (Costa Rica y Panamá) hasta Suramérica, en Venezuela, Guyana, Guyana Francesa, Suriname, Ecuador, Bolivia, Perú, Brasil, Colombia (Rivero y Brunner, 2006; Medellín, 2015) y que se cosecha en Venezuela en la zona del alto Apure, por lo que ha sido poco explotado a nivel industrial, es relativamente económico y con excelentes condiciones nutricionales (aminoácidos, vitaminas,

minerales, carbohidratos) (Chávez *et al.*, 2012), apropiadas para el desarrollo de este tipo de microorganismo.

En lo que se refiere a la composición química del *Garcinia madruno*, algunos autores como Tardío *et al.*, (2002) y Ruíz (2014) afirman que este fruto se consume principalmente al natural, tiene un sabor agridulce agradable, y en Colombia se ubica en las zonas de Bogotá, Medellín y Popayán. Asimismo, Castillo (2008) refleja que el porcentaje de grasa que se encuentra en la pulpa, indica la presencia de otras sustancias de igual polaridad como pueden ser las vitaminas liposolubles (A, D, E, K); además es rico en carbohidratos (Tabla 1) lo que favorece el crecimiento de los *Lactobacillus* del género *casei*.

Tabla 1. Características fitoquímicas de la pulpa del Madroño según su procedencia.

Análisis % m/m	Bogotá 1992	Medellín 1990	Popayán 2007
Ceniza	0,2	0,1	0
Grasa	0,1	0,1	0,6
Fibra	1	1	0
Carbohidratos	9,9	5,7	13,3
Agua	88,3	88,3	84,3
Proteína	0,5	0,5	1,5
Kcal/100g Muestra	38,3	38,3	65,8
mg ácido Ascórbico /100g Muestra	10	10	3,12
pH	No referenciado	No referenciado	5,03

Fuente: Castillo, (2008).

En ese mismo sentido, la evaluación de la eficiencia del *Garcinia madruno* representa un aporte significativo a la calidad de vida del ser humano visto desde el enfoque de la biotecnología, ciencia multidisciplinaria que ha hecho posible que por medio del cultivos de microorganismos, se generen sustancias benéficas para el

organismo que puedan ser utilizadas para obtener alimentos más saludables, mejores medicamentos, materiales más resistentes o menos contaminantes, cultivos más productivos, fuentes de energía renovables e incluso sistemas para eliminar la contaminación; siempre y cuando se utilicen técnicas para su desarrollo que le brinden las condiciones adecuadas para el óptimo crecimiento de microorganismos (Cravo *et al.*, 2015). La Figura 1 muestra un esquema de cómo se efectúa el abordaje del problema.

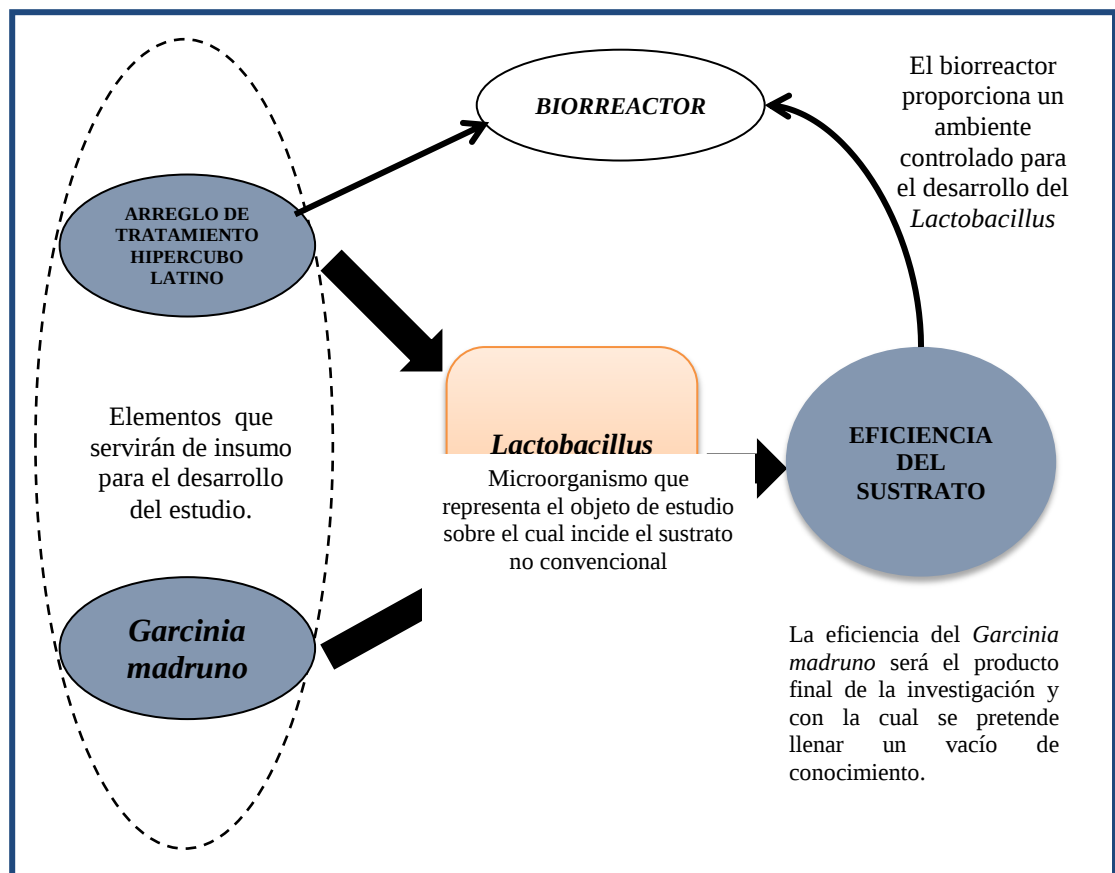


Figura 1. Representación Esquemática: Abordaje del Problema

Fuente: Autor, 2020

En este sentido se plantean las siguientes preguntas de investigación:

Eficiencia del Garcinia madruno como sustrato en la producción efectiva de biomasa de Lactobacillus casei

¿Es posible evaluar la eficiencia del *Garcinia madruno* como contribución en la producción efectiva de biomasa de *Lactobacillus casei*?

¿Es posible caracterizar física, química y microbiológicamente el sustrato *Garcinia madruno*?

¿Es posible diseñar el arreglo de tratamientos óptimos de hipercubo latino escalable para el proceso de producción de *Lactobacillus casei*?

¿Es posible optimizar vía simulación las condiciones operativas del proceso de producción del *Lactobacillus casei* empleando como sustrato *Garcinia madruno*?

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia del *Garcinia madruno* como contribución en la producción efectiva de biomasa de *Lactobacillus casei*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar física, química y microbiológicamente el sustrato *Garcinia madruno*.
- Diseñar el arreglo de tratamientos óptimos de hipercubo latino escalable para el proceso de producción de *Lactobacillus casei*
- Optimizar vía simulación las condiciones operativas del proceso de producción del *Lactobacillus casei* empleando como sustrato *Garcinia madruno*.

- Determinar la eficiencia productiva empleando el método no paramétrico DEA (Data envelopment analysis).

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Dentro del marco de la investigación es imprescindible definir los términos o variables que se están estudiando; resultando la operacionalización la herramienta más apropiada, debido a que se emplea para designar al proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a términos concretos, observables y medibles, es decir, dimensiones e indicadores (Arias, 2012). Al respecto, se debe clarificar lo que son definiciones conceptuales representadas por las teorías (literaturas científicas) y operacionales descritas por las actividades que un observador debe registrar para poder medir la variable (Tabla 2).

Tabla 2. Definición conceptual y operacional de las variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	CONCEPTUAL	OPERACIONAL		
			Definición	Unidad	Técnicas e Instrumentos
Cantidad de lactosa	Independiente	Es la cantidad de disacárido o azúcar (formado por la glucosa y la galactosa) que dispone la leche.	Cantidad de azúcar (formada por glucosa + galactosa) expresada en peso por unidad de volumen.	g/l	Observación directa y guía de observación
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
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
Aireación (flujo)	Independiente	Es la cantidad de aire comprimido, medido como volumen, suministrado por el compresor por unidad de tiempo.	Es el flujo de aire o burbujeo, expresado en unidad de volumen por tiempo	cfm	Observación directa y guía de observación

Fuente: Autor, 2020

Tabla 2. (Continuación) Definición conceptual y operacional de las variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	CONCEPTUAL	OPERACIONAL		
			Definición	Unidad	Técnicas e Instrumentos
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
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
Tiempo de fermentación	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.		Observación directa y guía de observación
Concentración de Biomasa	Dependiente	Cantidad de microorganismos (<i>Lactobacillus casei</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.
Concentración de etanol	Dependiente	Cantidad de etanol que se encuentra en el biorreactor en un momento dado	Cantidad de etanol expresada en peso por unidad de volumen	g/l	Observación directa y guía de observación
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, termocupla

Fuente: Autor, 2020

JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La presente investigación se encuentra enmarcada según el Plan de la Patria 2013-2019 para Venezuela, en las políticas y programas del Sector Salud N° 10, que buscan aumentar la producción de medicamentos, vacunas e insumos médicos del

Sistema Público Nacional de Salud y la formación de trabajadores para la satisfacción de su demanda. Asimismo se ubica en el programa de recursos científicos, técnicos e insumos para la Salud.

Hecha la observación anterior y considerando la grave crisis que ha venido enfrentando el sector salud en Venezuela, sobre todo en el tema relacionado con la producción de medicamentos, que se asocia directamente a la carencia de materia prima que presentan los laboratorios al momento de elaborar los fármacos, donde los reconstituyentes de la flora bacteriana no escapan de esa realidad, a tal grado que durante los meses de marzo a mayo del 2018 el índice escasez para los medicamentos indicados en caso de evacuaciones líquidas se ubicó en el 85 por ciento (CONVITE, 2018), lo que lo convierte en un factor que afecta claramente la calidad de vida del ser humano.

En relación con esto último, es evidente que existe una imperiosa necesidad de producir medicamentos que contrarresten patologías tan importantes como las evacuaciones líquidas y trastornos gastrointestinales, en ese mismo sentido el microorganismo *Lactobacillus casei* representa una alternativa, debido a que ha sido ampliamente demostrada su acción probiótica y su eficacia en el aligeramiento de enfermedades bacterianas patógenas gastrointestinales (Marín *et al.*, 2016).

En este propósito, en la actualidad se han aumentado los esfuerzos de investigación en la producción de compuestos de uso común, enfocados en disminuir costos a partir de nuevos sustratos, nuevas técnicas y tecnologías que permitan tener altas productividades y rendimientos (Panesso *et al.*, 2015), evidenciándose entonces que la evaluación de la eficiencia de sustratos no convencionales como es el caso del *Garcinia madruno*, rico en macro y micro nutrientes (Chavez *et al.*, 2012), representa una opción para generar productos de interés biotecnológico capaces de conservar la actividad biológica del *Lactobacillus casei*, microorganismo estimulador del sistema inmune (Matsuzaki, 1998).

En los marcos de las observaciones anteriores la investigación refleja su importancia en el aporte a los siguientes escenarios:

Aporte al conocimiento Universal

- Con los resultados de la investigación se realiza un aporte al conocimiento universal al evaluar con base científica la eficiencia de un fruto poco conocido como el *Garcinia madruno*, en la producción de microorganismos probióticos del tipo *Lactobacillus casei*.

Aporte a la sociedad y productividad

- Mejora la calidad de vida del ser humano al presentar una alternativa para la producción de *Lactobacillus casei* a partir de *Garcinia madruno*, que permita reducir los costos con la finalidad de que pueda llegar a todas las familias, en especial las mas desprotegidas económicamente y así combatir las enfermedades como la evacuación líquida y la intolerancia a la lactosa.

Aporte a la salud

- Permite el fortalecimiento contra enfermedades gastrointestinales manteniendo un equilibrio de la flora bacteriana en el intestino delgado y a su vez del sistema inmunológico del ser humano, previniendo la evacuación líquida con una flora intestinal estable y bien equilibrada.

Aporte metodológico

- Diseño de una nueva propuesta para el aprovechamiento de un fruto que contiene gran cantidad de nutrientes que garantizan un medio de cultivo apropiado para el desarrollo del *Lactobacillus casei*.

ALCANCES

En esta investigación se evaluó la eficiencia del *Garcinia madruno* como sustrato en la producción efectiva de biomasa a escala de laboratorio de cepas del género *Lactobacillus casei*. El tipo de equipo que se utilizó 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 de forma sencilla.

La investigación centró su atención en la evaluación de la eficiencia de un sustrato no convencional como es el caso del *Garcinia madruno*, fruto de sabor agrídulce agradable, poco explotado a nivel nacional pero rico en nutrientes (Chavez *et al.*, 2012), que favorece la producción de biomasa de *Lactobacillus casei*, microorganismo perteneciente al grupo probiótico, que se caracteriza por ejercer una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción patógena de agentes enteropatógenos específicos, mediante distintos mecanismo de acción (Amores *et al.*, 2004). Es evidente entonces que la producción de este microorganismo contribuye en la salud manteniendo los sistemas de defensa del intestino suficientemente activos en sus tres grandes líneas: flora intestinal, mucosa intestinal - epitelio, y el sistema inmunitario, para que proporcionen una respuesta eficaz a cualquier agresión externa, de tal forma de mejorar la salud intestinal y estimular el sistema inmunológico (Salminen *et al.*, 1998; Torres, 1999).

Hechas las observaciones anteriores y considerando los beneficios que este tipo de microorganismo le provee a la industria alimenticia y farmacéutica, resulta de gran interés emplear medios de cultivos diferentes a los convencionales (peptona, extracto de carne y extracto de levadura, entre otros) a fin de abaratar los costos de producción sin que se vean afectados los requerimientos nutricionales del

Lactobacillus casei, que son esenciales para garantizar el crecimiento celular como lo son carbohidratos (fuentes de carbono y energía), aminoácidos, vitaminas y nucleótidos (Bergey y Holt, 1994).

Asimismo, la validación de los resultados de la investigación propuesta se realizó a través de la simulación del proceso seleccionado, utilizando herramientas computacionales como Análisis Frontier Banxia para la eficiencia y SAS JMP 8 (2014) para el análisis del experimento.

MARCO TEÓRICO

Este apartado de la investigación contempla los aspectos teóricos que ayudan a precisar y organizar los elementos contenidos en la descripción del problema (Tamayo, 2004), de tal forma que puedan ser manejados y convertidos en acciones completas, a fin de evaluar la eficiencia del *Garcinia madruno* como contribución en la producción efectiva de biomasa de *Lactobacillus casei*.

ANTECEDENTES

Los antecedentes se refieren a los estudios previos relacionados con el problema planteado, investigaciones realizadas anteriormente y que guardan alguna vinculación con el problema en estudio (Guffante *et al.*, 2016). Los mismos reflejan los avances y el estado actual del conocimiento en un área determinada y sirven de modelo o ejemplo para futuras investigaciones, son una guía para el investigador y le permiten hacer comparaciones y tener ideas sobre cómo se trató el problema en esa oportunidad. Hechas las consideraciones anteriores algunos trabajos recientes de investigación relacionados con el tema de estudio se citan a continuación:

Mustafa *et al.*, (2019). Effects of Agitation Speed and Kinetic Studies on Probiotication of Pomegranate Juice with *Lactobacillus casei*. En esta investigación el jugo de granada se fermentó con *Lactobacillus casei* a diferentes velocidades de agitación que varían desde 0 (microaerofílica) a 150 rpm a 37 °C. Las propiedades funcionales del jugo de granada probiótica fueron evaluadas en términos de crecimiento (biomasa), producción de ácido láctico, actividad antioxidante, contenido fenólico total y metabolitos clave usando LC-MS / MS. Se monitorizó la cinética de crecimiento de la fermentación en la condición óptima usando un método de factor a tiempo. Se observó alto crecimiento celular ($3,58 \cdot 10^{10}$ ufc / ml o $7,9 \text{ gL}^{-1}$) para el jugo de granada probiótica de *Lactobacillus casei* agitado a cero rpm. Los resultados de este estudio revelan el potencial del jugo de granada como medio para el cultivo de *Lactobacillus casei*

sin suplementación de nutrientes. La mejora de la actividad antioxidante en el jugo probiótico podría ser debido al incremento de quercetina-3-glucósido. Por lo tanto, *Lactobacillus casei* creció bien en jugo de granada con una alta viabilidad celular y actividad antioxidante en una condición no agitada. El jugo de granada es una bebida potencialmente funcional. Del enfoque presentado por estos autores, se toma en consideración los rangos de operación para la velocidad de agitación, debido a que este es un parámetro que permite garantizar una mezcla homogénea facilitando al microorganismo el acceso a los nutrientes.

Carrillo *et al.*, (2019). Colombia. Chemometric classification of *Garcinia madruno* raw material: impact of the regional origin and ripeness stage of a neotropical exotic species. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión y la variabilidad de los marcadores químicos de *Garcinia madruno* de acuerdo con la parte de la planta utilizada, el origen y la etapa de madurez, mediante la aplicación de herramientas quimiométricas. Se valoraron un total de 167 muestras y se cuantificaron 27 compuestos por muestra. La expresión de amentoflavona, biflavonoides de tipo moreloflavona y benzofenonas poliisopreniladas (PIB) promovió la diferenciación intergrupar, mientras que la expresión de biflavonoides de tipo GB-2a promovió la generación de grupos intragrupo. El epicarpio fue la principal fuente de biflavonoides y la fuente secundaria de PIB, con valores de hasta el 25 por ciento en algunos individuos. El origen de la fruta impactó significativamente la expresión de metabolitos, mientras que la etapa de madurez no. Los resultados indican que el epicarpio es una buena fuente de compuestos funcionales y, con un desarrollo agronómico apropiado, podría mejorarse aún más. Se toma en cuenta esta investigación, porque permite obtener información de interés relacionada con la caracterización química del *Garcinia madruno*.

Resvani *et al.*, (2017). Iran. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. Se investigaron los comportamientos cinéticos de cinco cepas de *Lactobacillus* con modelos Contois y exponenciales. El conocimiento del comportamiento cinético de los

microorganismos es esencial para el diseño y la ampliación de sus procesos industriales. *Lactobacillus bulgaricus* se introdujo como la cepa más eficiente con el mayor rendimiento de biomasa y ácido láctico de 0,119 y 0,602 gg⁻¹ de lactosa consumida, respectivamente. El rendimiento de biomasa y carbohidratos de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus lactis* fue ligeramente menor y cercano a *Lactobacillus bulgaricus*. *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii* tuvieron el menor rendimiento de biomasa, casi 11,8 y 22,7 por ciento menos que *Lactobacillus bulgaricus*, respectivamente. *Lactobacillus bulgaricus* ($R^2 = 0,9500$ y 0,9156) y *Lactobacillus casei* ($R^2 = 0,9552$ y 0,8401) mostraron una consistencia aceptable con ambos modelos. La investigación reveló que el modelo Contois es mejor que el exponencial para describir el crecimiento celular y el comportamiento de consumo de lactosa de las cepas de *Lactobacillus*. Las ideas expuestas por los autores han sido tomadas en consideración, debido a que proponen opciones para establecer el modelo de crecimiento del *Lactobacillus casei*.

Jaime (2016). España. Formulación en el análisis envolvente de datos (DEA). Esta investigación permitió la medición de la eficiencia a través del análisis envolvente de datos (DEA) y en particular se centró en el modelo DEA-CCR. En este propósito contempló la implementación del software libre R para la resolución del modelo DEA-CCR en todas sus variantes. El conocimiento aportado por esta investigación se toma en cuenta para el estudio, porque se exponen los fundamentos teóricos de la metodología basada en DEA.

Velásquez *et al.*, (2015). Colombia. Crecimiento de *Lactobacillus casei ssp casei atcc 393* en suero clarificado. En este trabajo se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393, cultivado en suero de leche clarificado en fermentación por lotes. Se observó el efecto de los factores sobre la velocidad específica de crecimiento y la producción de biomasa, utilizando para cada parámetro evaluado la metodología de superficie de respuesta, empleando un diseño central compuesto rotatable. Los resultados obtenidos del modelo para maximizar la velocidad de crecimiento específica a

0,061 h⁻¹ el proceso debe ser realizado a pH cercano de 7,1 y temperatura de 36,9 °C, y para maximizar la producción de biomasa a 11,58 g/L debe realizarse a pH de 7,0 y temperatura de 35,7 °C, estos resultados ratifican el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei*. Los aportes realizados por los autores han sido tomados en consideración, debido a que muestran los valores de pH y temperatura en el que el microorganismo ha demostrado gran capacidad para adaptarse y maximizar la producción de biomasa.

Cravo (2013), Venezuela. Esta investigación centra su atención en el diseño de un plan de calidad para la producción de biomasa de *Lactobacillus casei* usando como sustrato *Garcinia madruno*, con la finalidad de sistematizar de forma sencilla los procedimientos que garantizan la minimización de las no conformidades. Para ello se utilizaron materiales biológicos, vegetales, reactivos y aditivos acondicionados de acuerdo con las concentraciones de glucosa y con una temperatura controlada de 33 °C, pH de 4,5 por un periodo de 24 horas, para luego incubarse a 37 °C. El plan de calidad desarrollado permitió ofrecer una biomasa de *Lactobacillus casei* de excelente calidad (obtención cepas puras) que satisface las expectativas de los clientes aplicando en todas las acciones la filosofía de mejora continua y acentuando la importancia del microorganismo en las industrias farmacéuticas y de alimentos, debido a que al ser ingeridos, en cantidades suficientes, pueden ejercer una actividad fisiológica específica, beneficiando a la salud del individuo. Esta investigación ha sido considerada para el estudio, debido a que las ideas expuestas permiten precisar de forma clara y sencilla información de interés durante el proceso de producción del microorganismo.

Cravo (2012). Venezuela. Estrategias para el diseño de un control adaptativo en producción de bacterias ácido lácticas. Esta investigación centró su atención en primer lugar en el estudio de las características que poseen los cultivos semicontinuos a fin de identificar algunas de las variables que son prioridad para el control, debido a que influyen directamente en el crecimiento del *Lactobacillus casei*, aumentando o disminuyendo su productividad. Entre dichas variables se encuentran la velocidad de crecimiento y la velocidad de alimentación (caudal).

Asimismo, en este caso el modelo está formado por dos lazos: un lazo interno de realimentación ordinaria compuesta por la planta y el regulador y un lazo externo que ajusta los parámetros del regulador de tal forma que el error entre la salida de la planta y la referencia sea pequeño, convirtiendo al lazo externo en un lazo regulador. El conocimiento aportado en esta investigación se utiliza, para seleccionar las variables a ser consideradas en el modelado del proceso de producción del *Lactobacillus casei* a partir de *Garcinia madruno*.

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. Los conocimientos aportados por esta investigación, se emplean para establecer el modo de cultivo más eficiente en el proceso de producción del microorganismo.

Chávez *et al.*, (2012). Bolivia. Estudio del fruto comestible de la especie vegetal *Garcinia madruno*. En esta investigación se realizó un estudio de frutos de la especie vegetal *Garcinia madruno*, conocido en la parte amazónica del departamento de La Paz con el nombre de Camururu y en otras regiones con el nombre de Ocoró. En lo que se refiere a la parte comestible del fruto, se realizó un estudio bromatológico preliminar para la determinación de macro y micro nutrientes, también la degustación del fruto y del producto elaborado artesanalmente a partir de éste. Además se realizó un estudio fitoquímico preliminar. De acuerdo a los resultados expuestos y según las recomendaciones de energía y de nutrientes para la población boliviana que publicó el Ministerio de salud y Deportes el año 2007, se llegó a la conclusión que esta especie, es un fruto agradable rico en nutrientes que puede ser de mucha importancia para la dieta humana. Una forma de consumir este fruto, sería ingiriendo la pulpa, en preparaciones tipo refresco, que según los resultados de la prueba hedónica tienen

un grado de aceptabilidad alto (15). Se podría industrializar un concentrado de jugo, conserva de la pulpa y refresco elaborados con pulpa de este fruto. El procedimiento y resultados de esta investigación proveen de información de interés para la caracterización química del *Garcinia madruno*.

Lozano (2011). Chile. Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus casei shirota* en una gelatina de pitaya (*Stenocereus griseus* H.). En esta investigación se probó la viabilidad de una cepa probiótica muy conocida, con efectos positivos en la salud comprobados científicamente, en una gelatina preparada con pitaya. La gelatina se utilizó como un vehículo para que los probióticos lleguen al consumidor en un producto no lácteo. La pitaya aportó propiedades sensoriales a la gelatina, además, por su composición química es una excelente fuente de fibra y de compuestos antioxidantes. En ese mismo sentido se logró aislar a *Lactobacillus casei shirota* a partir de una alícuota de Yakult en agar MRS, se identificó al observar bacilos en cadena gram-positivos catalasa (-). Además se realizó el conteo microbiológico observando que *Lactobacillus casei shirota* microorganismo probiótico es capaz de sobrevivir sin descender su cuenta del intervalo aceptado para productos probióticos. El conocimiento aportado en esta tesis se utiliza para mejorar la metodología empleada para el proceso de producción del *Lactobacillus casei*.

Escobar *et al.*, (2010). Colombia. Esta investigación se enfocó en la evaluación de la producción de *Lactobacillus casei* y ácido láctico, adaptando como sustrato un subproducto de la industria láctea (lactosuero) enriquecido con diferentes cantidades de glucosa. Asimismo, estandarizaron las curvas de crecimiento bacteriano en lactosuero con una producción celular de $5,9 \times 10^{10}$ Ufc/ml en 75 h, y de ácido láctico de 70,39 y 76,24 g/L en 93 h, con cero por ciento y cinco por ciento de glucosa respectivamente. Igualmente estandarizaron un proceso de liofilización para conservar el *Lactobacillus casei* producido durante la investigación. Finalmente, se verificó la pureza de la cepa a través del kit API 50CH. Del enfoque presentado por estos autores, se toma en cuenta la forma de acondicionamiento (enriquecimiento) de los sustratos a fin de mejorar la eficiencia del proceso de producción del microorganismo.

BASES TEÓRICAS

Según Arias (2012), las bases teóricas constituyen un conjunto de conceptos y proposiciones desde un punto de vista o enfoque determinado, dirigido a explicar el fenómeno o problema planteado. En ese mismo sentido su desarrollo se inicia con los conceptos básicos y la mención de las teorías que permitirán evaluar la eficiencia del *Garcinia madruno* como contribución en la producción efectiva de biomasa de *Lactobacillus casei*.

MADROÑO

El madroño (*Arbutus unedo* L., *fam. Ericacea*) es una especie arbórea que cuenta con un bajo grado de esclerofilia (Gratani y Ghia, 2002). Crece en el norte de África, Oriente Medio, y el oeste y sur de Europa; también se encuentra ampliamente distribuido por la Península Ibérica y las Islas Baleares. Retoña vigorosamente después de las perturbaciones (como el corte o el fuego) y tiene una baja tasa de crecimiento. Aunque normalmente se encuentra como especie acompañante en los bosques mediterráneos, puede dar lugar a la formación de monte bajo dominado por esta especie después de fuegos recurrentes (Arnan *et al.*, 2013).

El madroño florece en otoño y tiene panículas colgantes, con 40-50 flores blancas cada una (Sealy y Webb, 1950), que son polinizadas por abejas relativamente grandes (Herrera, 2004). Produce frutos rojos esféricos de 7 a 30 mm de diámetro, que pueden contener más de 40 semillas. Observaciones preliminares en la zona de estudio sugieren que estos frutos tardan un año en madurar, y por ello, flores y frutos están presentes al mismo tiempo en el árbol en otoño e invierno. El madroño presenta cierta variación interanual en la producción de frutos (Herrera, 1998), aunque no muestra una clara vecería. También presenta una elevada variación interindividual en la producción de frutos, entre 2,6 y 10 kg de frutos al año por individuo. Sus frutos son una fuente de alimento para

animales, especialmente aves y mamíferos (Arianoutsou y Diamantopoulos, 1985; Quevedo *et al.*, 2017).

.CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

El madroño es un árbol de tradición en la ciudad de Madrid y su especie pertenece a la Familia Ericáceas, su nombre latino *Arbutus unedo* (*Arbutus*, nombre romano del "madroño", unedo significa comer uno solo) (López, 2001). Este árbol dioico, es de tamaño mediano, que alcanza de los 30 a los 45 pies de altura, tronco recto, corteza grisácea, copa simétrica. Hojas opuestas, de color verde oscuro, elípticas a oblongas, de 2 a 8 pulgadas de largo y 1 a 3 de ancho, que contienen un látex amarillo. Flores amarillentas, producidas en grupos de 1 a 15 en los nudos de las ramas. Fruta esférica, ovoide o elipsoide, de 2 a 3 pulgadas de largo, con cáscara gruesa, amarilla y cubierta de protuberancias; pulpa blanca, aromática, jugosa, de sabor agri dulce, y que contiene de 1 a 3 semillas (Rivero y Brunner, 2006).

Hechas las consideraciones anteriores entre las características morfológicas destacan:

- **Hábito de crecimiento:** arbusto de follaje siempre-verde.
- **Hojas:** simples, alternas, lanceoladas, finamente aserradas en el borde, de color verde algo brillante en la cara superior, verde pálido en la inferior, con corto pecíolo.
- **Flores:** blanco amarillentas, con forma de recipiente de abertura estrecha, dispuestas en panojas péndulas.
- **Fruto:** globoso, tuberculado, rojo (baya).
- **Observaciones:** florece en otoño (a partir de abril) al mismo tiempo que maduran los frutos del año anterior.

Adicionalmente, el madroño se distribuye por casi toda la Península Ibérica y Baleares, de preferencia en las provincias del litoral, en tierra baja y en las montañas poco elevadas. También en la España atlántica, suroeste de Francia, en algunas localidades del oeste de Irlanda, norte de África (excepto Egipto y Libia), Palestina y Macaronesia (región que comprende cinco archipiélagos del Atlántico Norte: Azores, Canarias, Cabo Verde, Madeira e Islas Salvajes) (Ruíz, 2014; Tardío *et al.*, 2002).

GARCINIA MADRUNO

Su nombre común proviene del inglés Madrono y lleva por nombre científico *Garcinia madruno* de la familia *Clusiaceae* (*Guttiferae*), se propaga por semilla. El crecimiento de los arbolitos es relativamente lento por los primeros dos a tres años, pero después crecen más rápidamente. Es fácil de cultivar, y se adapta bien a diferentes suelos y condiciones ambientales. Se ha informado que tiene tolerancia a suelos salinos. Fructifica de mayo a agosto.

En ese mismo sentido, los árboles son de 3-25 m de altura y 4-20 cm de DAP; tronco cilíndrico; corteza con lenticelas verticales; madera amarilla; látex amarillo o anaranjado. **Hojas** elípticas de 7-25 x 3-10 cm, haz brillante color verde oscuro y envés verde claro, ápice acuminado, base angostamente redondeada a aguda, nervios laterales secundarios e intersecundarios difícilmente diferenciables, 2-3 secundarios por cm y 4-5 intersecundarios por cm; nervio submarginal inconspicuo o evidente (Fig. 14); canales de resina evidentes en el envés; pecíolos finos de 8-20 x 1,5-3 mm (Fig. 15). **Inflorescencia masculina** en fascículos axilares con varias flores. **Flor estaminada** con más de 20 estambres libres de 1,5-5 x 0,2-1 mm, más anchos en la base, insertos debajo de un disco de 1,5-2 cm de diámetro; anteras amarillas de 0,2-0,5 mm de diámetro. **Inflorescencia femenina** axilar con dos flores por nudo; botones florales color verde claro. **Flor pistilada** con ovario cubierto por un estigma achatado y pedicelos de aprox. 2 cm de largo. **Cáliz** con 2 sépalos redondeados hacia el ápice, de 2-3 mm de longitud, intercalados con los pétalos. **Corola** con 4 pétalos de 4-8

x 3-4 mm, membranáceos, aromáticos, color verde claro a blanco. **Fruto** en drupa o baya ovoide a redonda, epidermis rugosa y dura, amarilla al madurar y marrón al secar, de 2-4,5 cm de diámetro, pedicelo de 1-3 x 0,2 cm, a veces con cáliz y estambres persistentes (Figura 2). **Semillas** 1-3, ovoides, color marrón claro a oscuro, de 1-3 cm de longitud, envueltas en una pulpa carnos, blanca (Figura 3) y dulce (Medellín, 2015).

El *Garcinia madruno* se encuentra en bosques primarios o riparios, planicies inundables, sobre suelos arenosos o en bosques húmedos tropicales con precipitaciones medias anuales entre 1000 y 3000 mm. También se puede encontrar en relictos de bosque, rastrojos bajos, bordes de camino y suelos drenados. Se distribuye desde América Central (Costa Rica y Panamá) hasta Suramérica en Venezuela, Guyana, Guyana Francesa, Suriname, Ecuador, Bolivia, Perú, Bolivia, Brasil y Colombia. En Colombia tiene una amplia distribución y se encuentra entre los cero y 2200 m de altitud (Rivero y Brunner, 2006; Medellín, 2015).

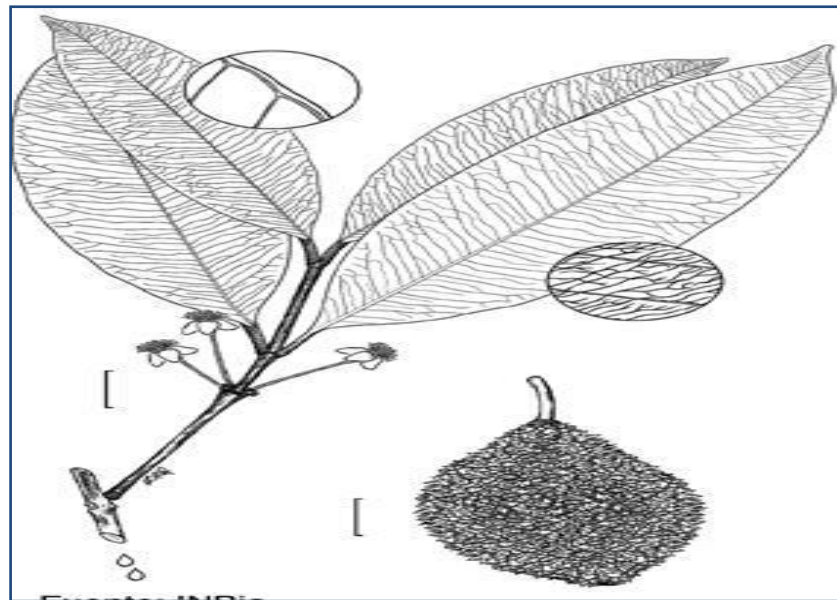


Figura 2. Caracteres diagnósticos de *Garcinia madruno*. Hojas, pecíolos, flores y fruto.

Fuente: Zamora *et al.*, 2004.



Figura 3. Fruto en drupa con epicarpio rugoso.

Fuente: Medellín, 2015.

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL FRUTO EN BOLIVIA

Los frutos de la especie vegetal *Garcinia madruno*, se conocen en la parte amazónica del departamento de La Paz con el nombre de camururu que significa amarillo en el dialecto Tacana y en otras regiones con el nombre de Ocoró que en el dialecto Chiquitano significa ácido o agrio. Esta especie es un árbol silvestre de 10 a 15 metros de alto, propio de los bosques húmedos, que crece en una altitud que no sea superior a los 600 m; está ampliamente distribuido desde el sur de México hasta Bolivia (Vásquez y Coímbra, 2002). El fruto se consume principalmente al natural, tiene un sabor agridulce agradable muy parecido al de *Garcinia brasiliensis*, además de ser rico en nutrientes (Tabla 3). También se utiliza en la elaboración de jaleas y jugos.

Tabla 3. Características químicas del *Garcinia madruno* de Bolivia en la localidad de Ixiamas (A), carretera hacia Pando (B), Río Undumo por la carretera Ixiamas-Pando (C)

Característica	Localidad A	Localidad B	Localidad C
pH	—	—	2,9
Acidez (g de ácido cítrico monohidratado /100 ml de jugo)	—	—	13,2
Vitamina A (µg/100 g)	4,48	-----	—
Vitamina C (mg/100 g)	0	—	24,74
Valor energético (Kcal)	399,1	397,1	395,7
Agua (%)	75,7	82,1	85
Nitrógeno (%)	0,6	0,68	0,59
Proteína (%)	3,8	4,2	3,7
Lípidos (%)	0,97	0,34	0,1
Carbohidratos (%)	93,8	94,3	95
Ceniza (%)	1,39	1,18	1,25
Sílice (%)	< 0,11	< 0,11	< 0,11
Ca (mg/100 g MS)	77,8	49,5	24,1
Mg (mg/100 g MS)	39,5	104,9	62,7
Na (mg/100 g MS)	8,6	1,9	2,1
K (mg/100 g MS)	511,9	417,4	546,4
P (mg/100 g MS)	85,7	105,7	108,3
Fe (mg/100 g MS)	27,3	18,7	31,1
Zn (mg/100 g MS)	8,7	9,8	9
Cu (mg/100 g MS)	10,5	7,8	9,3
Mn (mg/100 g MS)	5,1	3,4	4

Fuente: Chávez *et al.*, (2012).

ATRIBUTOS FARMACOLÓGICOS

El mesocarpio del fruto maduro es ácido y comestible. La infusión de la corteza se emplea para combatir la fiebre. El árbol es ornamental. Algunas

personas lo cultivan en las chagras y es comúnmente cultivado en sabanas. Se usa para conformar barreras contra el ruido y elementos contaminantes, controlar vientos, en corredores viales, separadores amplios, parques y plazoletas. La madera es moderadamente dura y pesada, de color amarillo, se emplea en la construcción y postes (Morales y Varón, 2006).

La fracción biflavonoide encontrada en el fruto de *Garcinia madruno* presenta actividad antioxidante. También se ha demostrado que los extractos de esta especie exhiben una moderada actividad contra bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) (Lim, 2012).

ESPECIES RELACIONADAS

Está relacionado con el mangostán (*Garcinia mangostana*) y más cercanamente con las especies americanas de *Garcinia*, como *G. macrophylla*, *G. brasiliensis* y *G. magnifolia* (a la que también se la llama madroño). No se conocen variedades del madroño; sin embargo, existe variabilidad para características de interés, como el tamaño y la calidad de la fruta, y la productividad de los árboles. Esta especie también se ha conocido como *Rheedia madruno*, *Rheedia acuminata* y *Calophyllum madruno*. Anteriormente se consideraba que el género *Garcinia* existía en el Viejo Mundo y *Rheedia* en el Nuevo, pero hoy está generalmente aceptado que no hay una distinción taxonómica verdadera entre las especies de estos dos grupos, y todas se consideran dentro del género *Garcinia* (Rivero y Brunner, 2006).

LACTOBACILLUS

Los microorganismos entre ellos las bacterias, han sido claves en el enfrentamiento y solución de problemas en la agricultura, alimentación, salud, y como nuevas fuentes de energía y conservación del medio ambiente (González *et al.*, 2002). Dentro de este grupo, se encuentran las “bacterias lácticas” que

producen lactato por la fermentación de azúcares simples a un pH ácido y a un tiempo definido, liberando productos que dan sabor a algunos alimentos.

Los *Lactobacillus* son organismos Gram positivos (+), inmóviles, no esporulados, microaerófilos, mejorando su crecimiento en anaerobiosis o bajo reducidas presiones de oxígeno y entre cinco y 10 por ciento de dióxido de carbono. Su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 40 °C. Su tolerancia al ácido varía desde 0,3 por ciento hasta 1,9 por ciento de acidez titulable (Gomes y Malcata, 1999). El pH óptimo para su crecimiento se ubica entre 5,5 y 6,2, pudiendo desarrollarse a pH menores de 5,0 (Kandler y Weiss, 1986). Según estos últimos autores, tal microorganismo presenta extremos redondeados, con dimensiones generalmente entre 0,6 - 0,9 por 1,5 - 6 µm y se encuentran en forma individual o asociados en pares o en cadenas cortas. De acuerdo a Shah (2001) produce una mezcla racémica de ácido láctico L (+) y D (-), precisando de una vez, que el género *Lactobacillus* está distribuido en varios nichos ecológicos a través del tracto gastrointestinal y genital y constituye una fracción importante de la microflora indígena del hombre.

Adicionalmente, las bacterias ácido lácticas como es el caso de los *Lactobacillus* se clasifican como anaeróbicas facultativas con un metabolismo estrictamente fermentativo que comprende una serie de procesos, que interactúan entre sí, en una serie de reacciones complejas en ausencia de oxígeno, haciendo parte importante de los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre, entre otros., ofreciendo ácido láctico como producto principal de la fermentación de azúcares (Corrales *et al.*, 2015). Estas bacterias obtienen su energía solo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, crecen anaeróbicamente. En ese mismo sentido la capacidad biosintética de dichas bacterias es limitada y sus complejos requerimientos nutritivos incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Madigan *et al.*, 2004). Además es importante mencionar que tienen alta tolerancia de pH por debajo de 5 la cual le da ventajas competitivas frente a otras bacterias (Ramírez *et al.*, 2011).

Las bacterias ácido lácticas se pueden dividir en géneros principales como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Géneros de las bacterias ácido lácticas

Géneros	Especies
<i>Lactobacillus</i>	<i>Acidophilus, casei, fermentum, gasseri, johnsonii, lactis, paracasei, plantarum, reuteri, rhamnosus, salivarius, bulgaricus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Thermophilus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Cremoris, lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Faecium</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidum, breve, lactis, longum, infantis, adolescentes</i>

Fuente: Macfarlane y Commings (1999)

LACTOBACILLUS CASEI

Lactobacillus casei forma bacilos cortos en cadenas cortas o largas, con temperatura óptima de 30 °C; máxima entre 37 – 40 °C, en algunos casos incluso hasta 45 °C; mínima aproximadamente 10 °C. Esta especie puede formar hasta un 1,5 % de ácido en leche, pero debido al crecimiento bastante lento del microorganismo, solo coagula leche después de tres a cinco días. De los disacáridos prefiere la lactosa. En ausencia de azúcar puede utilizar los lactatos como fuente de carbono. *Lactobacillus casei* contiene muchas endozimas, que después de la muerte de la bacteria atacan la caseína y la pueden degradar en combinaciones solubles (Yuki *et al.*, 1999; Brink y Todorov, 2006).

Asimismo el *Lactobacillus casei* es un microorganismo que habita en la boca, vagina y en los intestinos, no afecta al organismo, genera ácido láctico lo que colabora en la inhibición del desarrollo de bacterias dañinas y contribuyen en la proliferación de las benéficas. Al ser favorable la digestión, merma la intolerancia a la lactosa, ayuda a que el intestino funcione adecuadamente y evita las evacuaciones líquidas infecciosas, y enfermedades gastrointestinales, las industrias alimenticias, industrias farmacéuticas y en especial las lácteas, determinaron la utilidad rentable y lo incorporaron en sus alimentos funcionales (Ramírez *et al.*, 2011).

En general los *Lactobacillus* producen ácido láctico de la fermentación de determinados azúcares, lo que da como resultado el yogur a partir de la leche, se ha comprobado que el *Lactobacillus casei* tiene efecto beneficioso sobre el sistema defensivo del cuerpo pero no existen pruebas suficientes que determine su eficacia en la protección ante determinadas enfermedades como la gripe, los resfriados, una larga lista de contribuciones ha documentado propiedades funcionales probióticas de *Lactobacillus casei*: efecto antimicrobiano (Brink y Todorov, 2006).

Lactobacillus casei es considerado como un microorganismo probiótico, anaeróbico facultativo del género *Lactobacillus*; son microorganismos de metabolismo degradativo (catabólico) generalmente unicelulares. Estos m.o son autónomos y nutricionalmente independiente (autótrofo), sus células no utilizan la glucólisis para respirar en cambio utiliza vías alternas, donde una molécula orgánica durante el proceso metabólico (metabolismo) 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 (Gálvez *et al.*, 2007).

Por su parte este microorganismo productor de ácido láctico se emplea en la industria láctea en la elaboración de alimentos probióticos (alimentos que contienen microorganismos vivos que ejercen importantes efectos fisiológicos si

se ingieren en cantidades adecuadas). En ese mismo sentido la mayoría de los probióticos estudiados pertenecen a los géneros que conforman el grupo de las bacterias lácticas (BAL), como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. A nivel general, el concepto de alimentos funcionales tiene su origen en una mayor comprensión de las bases moleculares de la relación existente entre alimentación y salud y la posibilidad de contar con reguladores biológicos, donde las bacterias lácticas juegan un papel protagónico que disminuyan el riesgo de contraer enfermedades. La demanda del mercado nacional e internacional impulsó en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales: los probióticos, éstos además de su valor nutritivo ayudan a mantener el estado de salud general de organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo.

En relación con este último la Food and Agriculture Administration (FAO, 2002), define los probióticos como “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas”. Otra definición posible es: “alimentos susceptibles de producir un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas del organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, de mejorar el estado de salud y de bienestar y/o de reducir el riesgo de una enfermedad”.

En ese mismo sentido para que un organismo sea considerado probiótico debe cumplir los siguientes requisitos:

- Caracterización in vitro.
- Estabilidad fenotípica y genotípica, b) patrones de utilización de carbohidratos y proteínas.
- Resistencia a la acidez gástrica.
- Resistencia a la bilis.

- Adhesión al epitelio intestinal.
- Resistencia a lisozima (opcional).
- Capacidad de utilizar prebióticos (opcional).
- Ensayos in vivo e in vitro que demuestren el (los) efecto(s) probiótico(s) adjudicado(s).
- Carácter GRAS (“Generally Regarded As Safe”: reconocido como seguro para la salud).
- No presentar resistencia a antibióticos ni determinantes de patogenicidad.

En este mismo orden y dirección está comprobado que las bacterias probióticas, principalmente *bifidobacterias* y *lactobacilos*, ejercen efectos benéficos en la salud mediante interacciones con el intestino y sus metabolitos. Por eso, es fundamental la relación existente entre la microflora intestinal y el estado de salud de las personas (León, 2012; Taranto *et al.*, 2005). Una mala alimentación produce una elevada presencia de sustancias perjudiciales que, al ser utilizadas por bacterias nocivas presentes en el intestino, afectan la salud del receptor.

En el intestino, tanto los microorganismos beneficiosos como aquellos potencialmente patógenos pueden competir por los mismos nutrientes para crecer y reproducirse. Por lo tanto, cuanto mayor es la población de las bacterias beneficiosas en el intestino, mayor será la competencia con los microorganismos patógenos.

Dentro de las bacterias lácticas, el mayor número de estudios y evidencias documentadas sobre sus efectos benéficos para la salud humana corresponden a *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* y principalmente *Lactobacillus casei*.

Es evidente entonces que los probióticos ejercen acciones diversas sobre la salud mediante diferentes mecanismos: acidificando el lumen intestinal, segregando sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, consumiendo nutrientes específicos, interactuando o uniéndose competitivamente a los receptores intestinales para mantener una microflora intestinal normal, o evitando la acción de gérmenes patógenos. También contribuyen segregando enzimas y metabolitos específicos que confieren a estas bacterias benéficas otras propiedades funcionales, como la capacidad de regular lípidos séricos, de proteger la mucosa gástrica, de prevenir cuadros de vitaminosis B12 o de disminuir los síntomas de intolerancia a la lactosa.

Asimismo, se ha propuesto el consumo de probióticos como la alternativa más eficaz para atacar los distintos problemas presentados (James *et al.*, 2017) cuando se administran antibióticos, para tratar enfermedades infecciosas bacterianas, debido a que éstos al ser de amplio espectro eliminan a los patógenos conjuntamente con la micro-flora intestinal benéfica; además de que los efectos de los antibióticos son agresivos.

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 (Figura 4):

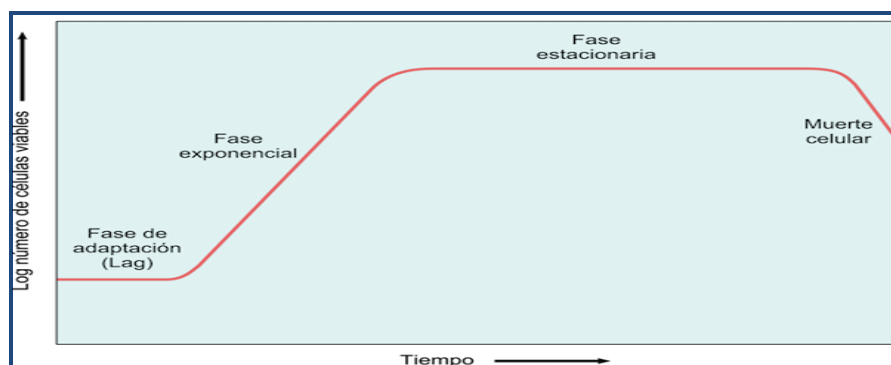


Figura 4. Curva de Crecimiento Microbiano

Fuente: Dos Santos (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 y el tiempo de generación es mínimo. 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.

SUSTRATO

Un sustrato es una sustancia, que colocada en un biorreactor a disposición de los microorganismos en forma pura o en mezcla, permite su crecimiento y desarrollo, interviniendo en el complejo proceso de nutrición de los mismos. En este propósito cualquier actividad biológica sobre los sustratos origina la degradación del mismo, los microorganismos compiten por oxígeno, y nutrientes disminuyendo las condiciones físico-químicas iniciales de partida (Cánovas, 1993).

En ese mismo sentido, los medios de cultivo utilizados para multiplicar la biomasa microbiana, durante la elaboración de inoculantes biológicos, deben desarrollarse a partir de sustratos que sean preferiblemente económicos, residuales, de amplia disposición a fin de garantizar la conservación de la actividad biológica por la que el organismo fue seleccionado (Angulo *et al.*, 2012). De esta forma, resulta muy útil el aprovechamiento de residuos agrícolas o agroindustriales, para la producción biotecnológica de productos biotransformados, con alto valor agregado, tales como metabolitos y biomasa microbiana (Domínguez *et al.*, 2002; Pantoja *et al.*, 2018).

BIORREACTOR

El biorreactor es un dispositivo o sistema empleado para hacer crecer células o tejidos en operaciones controladas de cultivo. Éstos se encuentran en desarrollo para su uso en ingeniería de tejidos. En términos generales, un biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, entre otros) al organismo o sustancia química que se cultiva (Hemson, 2006). El diseño de los biorreactores es una tarea de ingeniería relativamente compleja y difícil, debido a que debe proveer a los microorganismos o células las condiciones óptimas para que sean capaces de realizar su función con gran eficiencia. Las condiciones ambientales de un biorreactor tales como flujo de gases (nitrógeno, dióxido de carbono, entre otros), temperatura, pH, oxígeno disuelto y velocidad de agitación o circulación, deben ser cuidadosamente monitoreadas y controladas.

En este propósito el biorreactor es sin duda, uno de los equipos fundamentales de la microbiología industrial es el recipiente donde se realiza el cultivo, es un sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo (Escalada, 2010), y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos (Koshkin y Shirkevich, 1975), es por ello que entre sus objetivos figuran:

- Mantener el material biológico (microorganismos) distribuidas uniformemente en todo el volumen del cultivo.
- Mantener la temperatura constante en el cultivo.
- Minimizar la sedimentación y la floculación.
- Permitir la difusión de gases nutrientes a la velocidad requerida por el cultivo.
- Mantener el cultivo puro.
- Mantener el cultivo en un ambiente aséptico.
- Maximizar el rendimiento y la producción.

Sobre la base de las consideraciones anteriores los biorreactores se clasifican de diversas maneras, de acuerdo con el criterio que se utilice para ello: tipo y forma del biocatalizador, configuración del biorreactor, modos de operación, forma en la que se suministra la energía para la agitación, entre otros. Con base en las similitudes en el modelamiento matemático, los biorreactores pueden agruparse de la siguiente forma: biorreactores de tanque agitado, biorreactores de columna de burbujeo, biorreactores con biocatalizador inmovilizado y biorreactores con separación integrada de producto. Este criterio de clasificación tiene en cuenta, principalmente, la configuración del biorreactor y la disposición del biocatalizador (Rangel *et al.*, 2001).

CLASIFICACIÓN DE LOS BIORREACTORES

Los biorreactores se clasifican de diversas maneras, en función a los criterios de utilización, configuración o características propias (tipo, modos de operación, forma en la que se suministra la energía para la agitación, entre otros)

(Rangel *et al.*, 2001), que lo definen como un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo, se derivan las siguientes clasificaciones:

- **Clasificación operativa:** tanto biorreactores como fermentadores se clasifican en primer lugar de acuerdo al modo de operación: discontinuo, semicontinuo, continuo. Esta es una clasificación operativa y se aplica a cualquier reactor, sea químico o biológico (biorreactor). 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). Al operar un biorreactor en una determinada categoría (discontinua, semicontinua, continua), automáticamente queda determinado el modo de cultivo del sistema y se definen los parámetros y las características operativas y de diseño que intervienen en el proceso productivo del sistema.
- **Clasificación biológica:** los sistemas biológicos deben interactuar 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 unir ambas clasificaciones, se mezclan también la función operativa y la biológica para establecer entre ellas un

propósito de utilización, el modo de cultivo y el bioproceso, es decir su intención es el destino de cultivo del biorreactor; en pocas palabras 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.

FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento microbiano puede estar influido por una variedad de factores, tanto físicos como nutricionales. Los factores físicos incluyen: la concentración de iones hidrógeno (pH), la temperatura, la concentración de oxígeno, la humedad, la presión hidrostática, la presión osmótica y la radiación. Los factores nutricionales comprenden: la disponibilidad de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y otros minerales, y en algunos casos vitaminas (Junco y Rodríguez, 2001).

En referencia a la clasificación anterior los factores físicos están compuestos por:

- **Temperatura Óptima:** la temperatura es un factor ambiental que influye en el crecimiento del cultivo microbiano y celular, poniendo en juego la propia supervivencia de la célula o microorganismo, este factor afecta a las células microbianas cultivadas de dos formas: conforme aumenta la temperatura aumenta también la velocidad de las reacciones enzimáticas induciendo un rápido crecimiento, por encima de un máximo de temperatura se produce la desnaturalización de las proteínas celulares y la descomposición de los componentes celulares esenciales para mantener la vida, causando la muerte de las células o microorganismos en cultivo.
- **pH Óptimo:** Todo organismo vivo (microorganismo) posee un rango de pH dentro del cual es posible su crecimiento con normalidad; dentro de ese rango existe un pH óptimo en el cual el crecimiento es máximo y muy bien

definido. Al crecer el microorganismo en ambientes naturales, su rango de pH se acerca a los valores de hábitat en que se desarrolla, el rango normal de acidez en que pueden sobrevivir la mayoría de los microorganismos está comprendido entre pH 2,0 y 10,0.

La mayoría de los hábitats tienen valores de pH de 5,9 por lo que los microorganismos que se encuentran en estos ambientes tienen un pH óptimo equivalente a 5,9. Algunos rangos de pH óptimos son: para levadura entre 3,5 y 5,5; para bacterias entre 6,0 y 7,5; para mohos según la cepa se extiende entre 3 y 7; para células en cultivo entre 6,0 y 7,5. La forma exacta de la curva de acidez es muy variada y depende del metabolismo propio de cada microorganismo o célula.

- **Nivel de Oxígeno:** la presencia de oxígeno en el ambiente interno del biorreactor ocasiona que los productos de desechos del catabolismo celular de los microorganismos facultativos sean oxidados por lo que las espumas se tornan densas y jabonosas ocasionando serios problemas funcionales y contaminando el cultivo.
- **Sistema de Agitación:** el sistema de agitación tiene la función de generar la potencia adecuada para producir una mezcla homogénea dentro del recipiente, que maximice la difusión de gases en el líquido, minimice la producción de esfuerzos cortantes y la presión hidrodinámica local y global, para promover el acceso de nutrientes a los microorganismo, optimizar los fenómenos de transferencia de calor y masa.

MEDIO DE CULTIVO

El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes. Para que los microorganismos crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de

condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios, además tiene que estar exento de todo microorganismo contaminante (Casado *et al.*, 2012). Hecha la observación anterior se distinguen algunos tipos básicos de medios de cultivo atendiendo a:

- a) Su estado físico: líquidos, semisólidos, sólidos.
- b) Su utilidad práctica: Nutritivos, de enriquecimiento, selectivos y diferenciales.
- c) Usos generales: no selectivos, para cultivo de una amplia variedad de organismos difíciles de hacer crecer. A menudo están enriquecidos con materiales como: sangre, suero, Hemoglobina, glutamina, u otros factores accesorios para el crecimiento de las bacterias (Agar Sangre, Schaeffer, etc.).

COMPONENTES DE UN MEDIO DE CULTIVO

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos (López y Torres, 2006). En ese sentido de una forma muy general, los medios de cultivo se componen de (Tortora *et al.*, 2007):

- Una fuente de carbono. Normalmente son azúcares sencillos como, por ejemplo, glucosa, lactosa, etc., pero existen también algunos organismos que usan CO₂ (en este caso serían autótrofos, al igual que las plantas).
- Una fuente de nitrógeno. Se suelen usar proteínas parcialmente hidrolizadas, peptonas.
- Otros componentes, como Na⁺, K⁺, vitaminas, entre otros.

- Amortiguadores de pH (soluciones tampón o buffer). Son sustancias que ayudan a mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango adecuado para el crecimiento de los microorganismos. Por ejemplo, suelen usarse como tampones los fosfatos disódicos (Na_2HPO_4) o monosódicos (NaH_2PO_4). Existen preparados comerciales (infusiones o extractos) obtenidos a partir de tejidos animales como cerebro, corazón o hígado. Y a veces se usan también fluidos corporales como la sangre animal. Todos estos productos contienen los componentes básicos necesarios para el crecimiento de microorganismos.

Es importante tener en cuenta que hay ciertos tipos de microorganismos con requerimientos especiales para su desarrollo, que se añadirán al medio en caso necesario. Un componente importante que permite elaborar medios de cultivo sólidos es el agar, un polisacárido procedente de algas marinas que tiene la particularidad de fundirse en torno a 100 °C y gelificar alrededor de 40 °C. Si se tiene en cuenta que los microorganismos cultivados en clínica crecen en torno a 37 °C, es necesario que el agente gelificante se mantenga sólido a esa temperatura. Otra ventaja que ha hecho del agar el gelificante más adecuado en el cultivo de microorganismos es el escaso número de organismos que tienen capacidad para degradarlo (Barrero, 2016).

M.R.S. AGAR.

Es un medio de cultivo sólido selectivo, utilizado para el aislamiento y recuento de bacterias ácido lácticas, especialmente del género *Lactobacillus*. Este agar fue creado en 1960 por Man, Rogosa y Sharpe, llevando el medio el mismo nombre. Está compuesto por proteosa peptona, extracto de carne, extracto de levadura, glucosa, monoleato de sorbitán, fosfato dipotásico, acetato de sodio, citrato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y agar.

Asimismo las placas de agar M.R.S. pueden ser sembradas en superficie (agotamiento o con espátula de Drigalski), también puede ser sembrada por profundidad. Las placas deben ser incubadas a 37 °C en microaerofilia (4 por

ciento de O₂ y 5-10 por ciento de CO₂) durante 24 a 72 horas. En este sentido el método de sembrado se elige de acuerdo a la finalidad que se persigue (aislamiento o recuento) (Britania, s/f).

M.R.S. CALDO.

Es utilizado para el cultivo y enriquecimiento de *Lactobacillus* a partir de muestras clínicas y alimentos especialmente lácteos, el medio de cultivo por su composición (Tabla 5) permite un abundante desarrollo de todas las especies de *Lactobacillus* (Britania, s/f).

Tabla 5. Contenido y composición del caldo M.R.S

CONTENIDO EN g/l	
Digerido enzimático de tejido animal	10 g
Extracto de carne de res	10 g
Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	20 g
Acetato de sodio	5 g
Polisorbato 80	1 g
Fosfato de potasio	2 g
Citrato de amonio	2 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Sulfato de manganeso	0.05 g

Fuente: Britania, (s/f)

ANÁLISIS ENVOLVENTE DE DATOS (DEA)

El Análisis Envolverte de Datos (DEA) es una técnica no-paramétrica, determinista, que recurre a la programación matemática y surge a raíz de la tesis doctoral de Rhodes (1978) y puede considerarse como una extensión del trabajo de Farrell (1957), que permite la construcción de una superficie envolvente,

frontera eficiente o función de producción empírica, a partir de los datos disponibles del conjunto de unidades objeto de estudio, de forma que las unidades que determinan la envolvente son denominadas unidades eficientes y aquellas que no permanecen sobre la misma son consideradas unidades ineficientes. El DEA admite la evaluación de la eficiencia relativa de cada una de las unidades (Rincón *et al.*, 2016).

En este propósito se trata de un método para la estimación de fronteras de producción y evaluación de la eficiencia de una muestra de unidades de producción (DMU's o decisión making units, en la terminología habitual). En este tipo de análisis se calcula la eficiencia relativa para cada DMU comparando sus inputs y outputs respecto a todas las demás DMUs. Es un método de frontera, es decir que se evalúa la producción respecto a las funciones de producción, donde por función de producción se entiende el máximo nivel de output alcanzable con una cierta combinación de inputs, o bien, el mínimo nivel de inputs necesario en la producción de un cierto nivel de outputs. Por tratarse de un método no paramétrico, no requiere ninguna hipótesis sobre la frontera de producción, siendo la eficiencia de una unidad definida con respecto a las unidades “observadas” con mejor comportamiento. Este análisis se detiene en la identificación del “mejor comportamiento”, dando lugar a la posibilidad de benchmarking, en lugar de en el “comportamiento medio”, como hace el análisis de regresión (Bonilla, 1996).

Además de medir la eficiencia relativa, usando un DEA se obtiene:

- Una superficie envolvente empírica, que representa el comportamiento de los mejores.
- Una métrica eficiente para comparar resultados.
- Proyecciones eficientes sobre la frontera, para cada DMU ineficiente.

- Un conjunto de referencia eficiente para cada DMU, definida por las unidades eficientes más próximas a ella.

Sobre la base de las consideraciones anteriores existen varios modelos DEA, según sea requerida la optimización de los inputs para los outputs generados. Estos modelos matemáticos tienen dos versiones: rendimientos constantes a escala (CCR) y rendimientos variables a escala (BCC) (Rescala *et al.*, 2012). Las expresiones matemáticas de las dos versiones del modelo DEA se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Modelos DEA

	Modelo CCR:	Modelo BCC:
Función objetivo	$\text{Min}_{u,v} W_0 = \sum_{i=1}^m u_i x_{i0}$	$\text{Min}_{u,v,k_0} W_0 = \sum_{i=1}^m u_i x_{ij} - k_0$
Restricciones	$\sum_{i=1}^m u_i x_{ij} \geq \sum_{r=1}^s v_r y_{rj} \text{ com } j = 1, 2, \dots, n$	$\sum_{i=1}^m u_i x_{ij} - k_0 \geq \sum_{r=1}^s v_r y_{rj} \text{ com } j = 1, 2, \dots, n$
Restricción de normalización:	$\sum_{r=1}^s v_r y_{r0} = 1$	$\sum_{r=1}^s v_r y_{r0} = 1$
Variables de decisión (pesos)	$u_i; v_i \geq \varepsilon > 0$	$u_i; v_i \geq \varepsilon > 0 \quad k_0 \text{ es no restringida}$

Fuente: Rescala *et al.*, 2012

Si la unidad de negocios es eficiente será (100%) y existirá al menos un valor óptimo para cada una de las variables de decisión “u” y “v” positivos. El modelo BCC formulado arroja el valor de la constante “k₀”, el que indica los rendimientos a escala de la unidad bajo análisis. La “escala” es la dimensión de la producción de una empresa determinada según la variación proporcional y simultánea de los factores inputs y outputs. Los valores que puede asumir “k₀” (Tabla 7) son:

Tabla 7. Valores de k_0

$k_0 > 0$	$k_0 = 0$	$k_0 < 0$
Rendimientos crecientes a escala	Rendimientos constantes a escala	Rendimientos decrecientes a escala

Fuente: Rescala *et al.*, 2012

Hechas las consideraciones anteriores el abordaje de la eficiencia implica establecer, dada una referencia, el grado de relación entre la producción de uno o más resultados y el o los recursos que se consumen para ello. En ese sentido, el análisis envolvente de datos se presenta como una herramienta útil y poderosa para el estudio de los niveles de eficiencia relativa de las unidades capaz de manejar modelos de múltiples insumos o recursos y múltiples productos, con la ventaja de que las unidades que se evalúan se comparan directamente con una unidad semejante o con una combinación unidades semejantes y tanto los recursos como los resultados puede ser medidos en diferentes unidades entre sí (García, 2009).

MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo se describen las metodologías utilizadas en el desarrollo de la investigación, así como las técnicas e instrumentos aplicados; en tal sentido, Balestrini indica que “está referida a los métodos, las diversas reglas, registros, técnicas y protocolos con los cuales una teoría y su método calculan las magnitudes de lo real” (Balestrini, 2006, p. 125).

ENFOQUE EPISTEMOLÓGICO

La “epistemología” o filosofía de la ciencia, que se consolida a principios del siglo XX como una rama independiente de la teoría del conocimiento, se apoya en estos supuestos modernos e incluye en su objeto de estudio a cuestiones metodológicas. Estas cuestiones hacen referencia tanto a los procedimientos realizados para obtener un conocimiento que aún no se tiene, como a los procedimientos destinados a validar o justificar un conocimiento ya adquirido. A partir de aquí se institucionaliza una distinción, que pronto se torna clásica, entre dos contextos que pretenden agotar las dimensiones metodológicas de la ciencia: el contexto de descubrimiento y el contexto de justificación.

Sin embargo, el contexto de descubrimiento pronto resulta postergado, en tanto se advierte que no es posible formalizar las normas que conducen a los hombres a nuevos hallazgos cognoscitivos. En la situación de descubrimiento intervienen además de razonamientos lógicos, la inspiración y el azar. En este sentido afirma (Reichembach, 1953, p. 210, 211), responsable de la institucionalización de la citada distinción entre contextos:

El acto de descubrimiento escapa al análisis lógico; no existen reglas lógicas según las cuales pudiera construirse una “máquina descubridora” que asumiera la función creadora del genio. Pero la tarea del lógico no es explicar los descubrimientos científicos; todo lo que él puede hacer es analizar la relación que existe entre los hechos dados y la teoría que se le presente con la pretensión de que explica esos hechos. En otras palabras, a la lógica sólo le importa el contexto de justificación.

En este sentido, la investigación se realizó bajo el paradigma de la modernidad, enfocado en el positivismo según (Delgado, 1991); éste se establece como una relación precisa entre observación y teoría.

TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

TIPO DE INVESTIGACIÓN

En atención a las características que presenta esta investigación y a sus objetivos, la misma se encuentra enmarcada dentro de la modalidad exploratoria, que es aquella que se dedica al estudio de fenómenos relativamente desconocidos, a fin de obtener información sobre la posibilidad de llevar a cabo una investigación más completa respecto de un contexto particular, indagar nuevos problemas, identificar conceptos o variables promisorias, establecer prioridades para investigaciones futuras, o sugerir afirmaciones y postulados (Hernández *et al.*, 2014).

En este propósito los estudios exploratorios se realizan cuando el objetivo es examinar un tema o problema de investigación poco estudiado (Hurtado, 2012), del cual se tienen muchas dudas o no se ha abordado antes, como es el caso del empleo del *Garcinia madruno* como sustrato, para la producción de biomasa de *Lactobacillus casei*. En ese mismo sentido, la investigación hace énfasis en la recolección de datos en el contexto, porque permiten generar un conocimiento nuevo y para ello se vale de instrumentos como la observación directa.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Es el conjunto de decisiones estratégicas que toma el investigador, relacionadas con el dónde, el cuándo, el cómo recoger los datos, y con el tipo de datos a recolectar, para garantizar la validez interna de su investigación. Esto significa que para tomar tales decisiones, ya se debe haber cubierto una serie de

fases previas, por lo que el investigador debe tener la investigación delimitada, haber identificado sus eventos y sus unidades de estudio, su contexto y haberse aproximado a algunas técnicas de recolección de información. (Hurtado, 2012)

En ese mismo sentido, se asume como el plan global en cual se implican tanto los aspectos metodológicos de carácter estratégico y táctico, así como aspectos administrativos de la investigación, desde donde se intenta dar de una manera clara respuestas a las interrogantes planteadas. Vista así, constituye un marco de decisiones coherentes, integrativas e interactivas que determina y revela el propósito en términos de objetivos, las estrategias de acción y asignación de los recursos necesarios. (Puerta, 2011)

Hecha la observación anterior, esta investigación concentró su atención en un diseño de investigación experimental, el cual es concebido como una metodología matemática que define (crea) un conjunto óptimo de experimentos (tratamientos) en el espacio de diseño, con el fin de obtener la información más relevante posible con la máxima precisión y al menor costo. Esta exploración científica del espacio de diseño, requiere que la distribución de puntos en el espacio exploratorio de diseño, sea lo más homogénea posible, que estén a la misma distancia mínima; pero sin afectar los costos de experimentación; de tal manera de ajustar entre sus puntos cualquier modelo que un investigador desee, por muy complejo que sea; que cree conocimientos y descubra conexiones aparentemente no obvias o no evidentes, ya que esto es la base de la construcción de relaciones de causalidad novedosas (JMP, 2013; Ávila y Rivas, 2018) .

En este propósito, en la investigación se empleó un diseño de muestreo “space filling”, debido a que presenta siguientes ventajas:

- El diseño de muestreo forma una nube de puntos experimentales, que son a la vez un conjunto de nubes vecinos muy cercanos.
- El diseño de muestreo es optimal.

- No requiere repeticiones, ya que los puntos experimentales vecinos están a la mínima distancia posible entre dos puntos.
- Los puntos experimentales están uniformemente distribuidos, o sea los puntos múltiples están a una mínima distancia entre ellos.

Las ventajas anteriores, es lo que permite, trazar casi cualquier línea o superficie (modelo) a través de esta nube de puntos; bien una función lineal, no lineal e inclusive una función de paso o una función mixta (Ávila y Rivas, 2018).

Asimismo, entre los diseños de muestreo “space filling” se empleó el diseño de muestreo Hipercubo Latino (Latin Hypercube), debido a que es un compromiso entre la propagación de puntos y el espaciamiento uniforme. Maximiza la distancia mínima entre los puntos de diseño, sino que requiere incluso espaciamiento de los niveles de cada factor. Este método produce diseños que imitan la distribución uniforme. El método Latin Hypercube es un compromiso entre el método Sphere-Packing y el método de construcción homogéneo.

El Diseño Latin Hypercube Designs (LHD), se recomienda implementar: **A.** Si se espera que la producción 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.** Si se asume un modelo aditivo (aproximadamente), también se quiere un diseño cuyos puntos se proyectan 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 (SAS JMP 8, 2012; MathWorks, 2014; Phoenix Integration, 2014; Ávila y Rivas, 2018).

Por las consideraciones anteriores y tomando como referencia que el diseño de la investigación es el planteamiento de una serie de actividades sucesivas y organizadas que deben adaptarse a las particularidades de cada investigación (Tamayo, 2004), donde se manipularán las variables independientes o factores (ver Tabla 8), a fin observar directamente los cambios que provocará en

el evento de estudio (*Garcinia madruno*), se tomó la decisión de utilizar como herramienta en la investigación el diseño de muestreo Hipercubo Latino, a fin de evaluar la eficiencia de este sustrato como contribución en la producción efectiva de biomasa de *Lactobacillus casei*.

Tabla 8. Niveles (Variables de entrada) para los Factores Experimentales

Factor	Nivel mínimo	Nivel máximo
X ₁ : pH ([+])	4,30	5,40
X ₂ : Temperatura (°C)	30	38
X ₃ : Concentración de sustrato (%)	72	90
X ₄ : Concentración de lactosa (%)	11	27
X ₅ : Velocidad de agitación (rpm)	192	275
X ₆ : Velocidad de aereación (cfm)	1,2	2,3
X ₇ : Tiempo de fermentación (h)	8,3	11

Al mismo tiempo, la investigación empleó el diseño de laboratorio a partir de fuentes vivas o directas, debido a que permite aislar los eventos de estudio y ejercer un mayor control sobre ellos (Tabla 9), facilitando la manipulación, aleatorización y el control de las variables extrañas (Hurtado, 2012).

Tabla 9. Matriz “D” de diseño de tratamientos codificada, Hipercubo Latino con 7 factores experimentales, para las respuestas Concentración de Biomasa, Concentración de Etanol y Sólidos Solubles Totales (SSt).

Trat.	Factores Experimentales							Respuesta		
	X1 pH	X2 T (°C)	X3 sustrato (	X4 lactosa (%)	agitación (RPM)	Aereación (cfu)	X7 Tiempo (h)	Y1 (Ufc/ml)	Y2 Etanol (g/l)	Y3 Sol. Tot. (°Brix)
1	4,8	36	72	16	262	2,2	8,3			
2	4,6	36	84	19	261	1,4	12			
3	4,8	33	74	21	246	2	11			
4	4,4	37	83	24	237	1,5	14			
5	4,9	34	81	21	267	1,8	9,1			
6	5,3	33	83	21	224	1,9	12			
7	5,4	35	90	15	243	1,4	12			
8	5	31	83	21	192	1,2	9,8			
9	4,9	38	75	16	252	1,6	11			
10	4,6	31	84	23	254	1,6	10			
11	4,8	33	79	11	244	1,8	12			
12	4,3	36	77	24	255	2	12			
13	5,1	35	88	22	263	1,5	11			
14	4,8	37	80	15	252	1,9	13			
15	5,2	34	83	19	240	1,9	12			
16	4,8	38	75	17	235	1,5	9,2			
17	4,9	33	81	11	258	1,6	11			
18	4,5	34	78	19	229	1,6	11			
19	4,9	35	77	22	218	2,1	11			
20	4,9	35	77	23	247	1,6	11			
21	4,8	35	86	21	215	1,9	11			
22	5,3	32	77	16	275	2,3	9,3			
23	5,3	33	78	27	236	1,7	11			
24	5	37	82	13	246	1,5	9,6			
25	4,7	35	86	16	226	2,1	13			
26	5,1	30	82	25	236	1,6	12			
27	5,1	37	77	18	201	1,9	8,6			
28	5,2	35	77	20	265	1,7	9,9			

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). Después de la consideración anterior, esta investigación se llevará 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.

Asimismo, con referencia a la unidad de análisis esta puede ser definida como los elementos en los que recae la obtención de información y que deben de ser delimitados con propiedad, es decir precisar, a quien o a quienes se va a aplicar la muestra para efectos de obtener la información (Centty, s/f), en tal sentido en la investigación se corresponde con los *Lactobacillus* del genero *casei*.

POBLACIÓN

La población de una investigación está constituida por el conjunto de seres en los cuales se va a estudiar el evento, y que además comparten como características comunes, los criterios de inclusión; es a la población a quien estarán referidas las conclusiones del estudio (Hurtado, 2012).

En este propósito, en una investigación desde el punto de vista estadístico la población o universo puede estar referido a cualquier conjunto de elementos de los cuales pretendemos indagar y conocer sus características o una de ellas y para el cual serán validadas las conclusiones obtenidas en la investigación (Balestrini, 2006). Sobre la base de las consideraciones anteriores, en la investigación la población estuvo referida a 42000 ml, desglosada en la capacidad del biorreactor (1500 ml) por un total de 28 tratamientos.

MUESTRA

La muestra es una porción de la población que se toma para realizar el estudio, la cual se considera representativa de la población.

Una muestra estadística según Balestrini (2006), es una parte de la población, o sea, 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, la muestra de la investigación la conformaron un total de 1500 ml y para cada tratamiento la constituyeron 25 ml del sustrato inoculado cada hora por un lapso de 11 a 15 horas por corrida, a fin de que el subconjunto sea representativo de la población de microorganismos de *Lactobacillus casei*, como lo establece en las normas COVENIN 1337-90, utilizando las técnicas microbiológicas en el laboratorio de microbiología Aplicada.

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, 2006). Asimismo, puede ser definida como un conjunto de saberes prácticos o procedimientos para obtener el resultado deseado. Una técnica puede ser aplicada en cualquier ámbito de la ciencia: arte, educación, comunicación, entre otras. Por tanto, la técnica para la recolección de información se entiende como el medio práctico que se aplica en la obtención de información en una determinada investigación.

Partiendo de estas premisas se utilizó como técnica la observación directa es aquella en que el investigador observa directamente los casos o individuos en los cuales se produce el fenómeno, entrando en contacto con ellos; sus resultados se consideran datos estadísticos originales, por esto se llama también a esta

investigación primaria (Guffante, 2016). Al mismo tiempo, esta observación fue de tipo estructurada debido a que se realizó con la ayuda de elementos técnicos apropiados como lo son: tablas, donde se registrarán variables importantes para la producción de *Lactobacillus casei* como lo son: sólidos solubles totales, la concentración de biomasa y concentración etanol, de allí que se le denomine observación sistemática. A su vez, la observación también es de tipo laboratorio, porque se realiza con grupos humanos previamente determinados, para observar el comportamiento (crecimiento) de los microorganismos en el biorreactor y es de equipo o de grupo, debido a que se realiza por parte de un grupo de trabajo que efectúa una misma investigación (anexo 1). Todo esto define una observación directa de fuente primaria, debido a que se recoge a través de un contacto inmediato con el objeto de análisis (Hernández *et al.*, 2014); también se utilizó la observación directa de fuentes secundarias que es aquella que el investigador recoge a partir de investigaciones hechas por otros investigadores con propósitos diferentes o provenientes de libros, estadísticas, entre otros.; (Hernández *et al.*, 2014). En base a lo descrito anteriormente, se empleó la lectura de la bibliografía que describe el proceso de cultivo de *Lactobacillus* de la especie *casei*, la relacionada con el estado del arte sobre el modelado y simulación por computadora para biorreactores semicontinuos.

Por su parte, un instrumento de recolección de datos es en principio cualquier recurso de que pueda valerse el investigador para acercarse a los fenómenos y extraer de ellos información. De este modo el instrumento es un conjunto de medios tangibles que permiten registrar, conservar y plasmar todo lo investigado a través de las técnicas utilizadas (Cuauro, 2014), en este sentido sintetiza en sí 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). 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 utilizó la guía de observación para el proceso de medición de los sólidos solubles totales (consumo de azúcares), pH,

concentración de etanol, tiempo de fermentación y temperatura, los cuales se realizaron en intervalos de tiempo de 1 hora, desde la hora de inicio (h_0) hasta la hora final (h_{12}), también se emplearon para el conteo de la biomasa de *Lactobacillus casei* como se especifica en los formatos del plan de calidad FPC-001 (Plan de la calidad para la producción de biomasa de *Lactobacillus casei*) 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 especifican los instrumentos de medición para dichas variables de control como lo son termocupla, contador de placas, electrodo de pH, entre otros.

VALIDEZ Y CONFIABILIDAD DE LOS INSTRUMENTOS

VALIDEZ

La validez y confiabilidad reflejan la manera en que el instrumento se ajusta a las necesidades de la investigación. La validez hace referencia a la capacidad de un instrumento para cuantificar de forma significativa y adecuada el rasgo para cuya medición ha sido diseñado. Es decir, que mida la característica (o evento) para el cual fue diseñado y no otra similar (Hurtado, 2012), en términos generales, se refiere al grado en que un instrumento realmente mide la variable que quiere medir (Hernández *et al.*, 2014) se refiere al grado en que un instrumento realmente mide la variable que pretende medir.

En este propósito, los instrumentos de medición registraron datos observables que representan los conceptos o variables que intervienen en el proceso de producción de *Lactobacillus casei*.

CONFIABILIDAD

La confiabilidad de un instrumento de medición se refiere al grado en que su aplicación repetida al mismo sujeto u objeto produce resultados iguales, mientras que para Ander-Egg (2002, p. 44), el término confiabilidad se refiere a

"la exactitud con que un instrumento mide lo que pretende medir". Díaz *et al.* (2003, p. 7) afirman que un instrumento "se considera fiable si las medidas que se obtienen a partir de él no contienen errores o los errores son suficientemente pequeños". Centrado en lo anterior, la confiabilidad muestra hasta dónde los resultados obtenidos con la aplicación del instrumento son verdaderamente útiles, sólidos y consistentes, es decir que si se recogiera nuevamente, en la misma forma y con ese instrumento, realmente serían los mismos resultados (Hernández *et al.*, 2014).

TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE INFORMACIÓN

El procesamiento de la información tiene como fin generar datos agrupados y ordenados que faciliten al investigador el análisis de la información según los objetivos, hipótesis y preguntas de la investigación construidas. Por medio de los datos numéricos que ya están procesados y analizados se llega a un determinado resultado. En este propósito, el paso posterior al procesamiento de la información es el análisis, etapa en que se determina como razonar y comparar los datos, al mismo tiempo que se definirán las herramientas de análisis que serán utilizadas. En ese sentido, el tipo de análisis de los datos dependerá de factores como el nivel de medición de las variables, el tipo de hipótesis formulada y el diseño de investigación, este último indicará el tipo de análisis requerido para la comprobación de la hipótesis (Ávila, 2006). 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 (concentración de biomasa de *Lactobacillus casei*), concentración de etanol y sólidos solubles totales (grados Brix). En este propósito se empleó en principio un diseño estadístico de superficie de respuesta “Virtual Space Filling”, del tipo Hipercubo 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 utilizó 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 para la medición de la eficiencia el software Análisis Frontier Banxia, con el fin de minimizar Input (entradas) y maximizar Output (salidas), garantizando una alta calidad en la visualización de gráficos de todos los aspectos del análisis y una interfaz de fácil utilización por parte del investigador.

PROCEDIMIENTO

En esta etapa de la investigación se presentan de forma resumida cada uno de los pasos realizados para la recolección de los datos, dando respuesta a las interrogantes: Actividad, técnicas/instrumentos, y resultados parciales esperados (Mendoza, 2015). En el orden de las ideas anteriores, la investigación se desarrolló mediante las siguientes fases:

Fase I: caracterización física, química y microbiológica del sustrato *Garcinia madruno*. Durante esta fase de la investigación; se procedió a la determinación de las características físicas como densidad, así como las químicas proteínas, cenizas, sólidos solubles totales, entre otros. Por otra parte, se realizaron análisis microbiológicos como coliformes totales siguiendo para ello lo establecido en la norma COVENIN 1104:1996.

Fase II: diseño del arreglo de tratamientos óptimos de Hipercubo Latino Escalable para el proceso de producción *Lactobacillus casei*. Esta fase de la investigación se inició con diagnóstico de los factores significativos que intervienen en el proceso de producción del microorganismo *Lactobacillus casei*. Para ello, se realizó una revisión bibliográfica extensa que permitió cotejar y codificar la información, a fin de identificar los factores (variables independientes) que influyen en el desarrollo del microorganismo y las posibles respuestas esperadas en todo lo relacionado con el crecimiento microbiano, etanol y sólidos totales. En este mismo sentido, se realizó la operacionalización de las variables para dividir las en variables dependiente e independientes y emplearlas como insumo para la matriz “D” o del también llamado arreglo de tratamiento, asimismo se utilizó el diseño método Hipercubo Latino (Latin Hypercube) debido a que maximiza la distancia mínima entre los puntos de diseño (igual espaciado de los niveles de cada factor). Este método produce diseños que imitan la distribución uniforme. El método Latin Hypercube es un compromiso entre el método Sphere-embalaje y el método de construcción homogéneo. En ese mismo sentido, este tipo de diseño de arreglo de tratamientos permitirá 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 establecieron un total de 28 tratamientos, con siete factores experimentales (variables dependientes), X₁: pH en un intervalo

entre 4,3 – 5,40; X_2 : Temperatura con un rango aproximado de 30 – 38 °C, X_3 : Concentración de sustrato (*Garcinia madruno*) en un intervalo entre 72 – 90 por ciento, X_4 : Concentración de lactosa en un nivel comprendido entre 11 – 27 por ciento, X_5 : Velocidad de agitación con un rango aproximado de 192 – 275 rpm, X_6 : Velocidad de aireación en un intervalo entre 1,2 – 2,30 por ciento, X_7 : Tiempo de fermentación en un intervalo entre 8,3 – 11,00 por ciento, a fin de observar su nivel de influencia en tres respuestas fundamentales como lo son Y_1 : Concentración de biomasa medida en ufc/ml, Y_2 : Concentración de etanol en g/l Y_3 : Sólidos solubles totales en ° Brix,. Adicionalmente para lograr establecer los mínimos y los máximos de los factores experimentales se realizó previamente una prueba piloto, a fin de constatar en el biorreactor los niveles de influencia de cada uno de los factores en una de las respuestas más importantes dentro de la investigación como lo es el crecimiento microbiano.

Una vez determinados los máximos y mínimos de los factores experimentales, y descrito el número de tratamientos se procedió a realizar los siguientes pasos para cada uno de los tratamientos a fin de poder cuantificar cada una de las respuestas experimentales:

- **Paso 1:** en esta etapa se clasificaron los materiales, reactivos y equipos empleados en los procesos de acondicionamiento del sustrato (*Garcinia madruno*) y de producción del *Lactobacillus casei*.

MATERIAL BIOLÓGICO: *Lactobacillus casei* variedad *Rhamnosus*, fue adquirido en una conocida red farmacéutica a nivel nacional, su nombre es Liolactil fabricado por laboratorios Elmor, pertenece a los cultivo liofilizados en presentación de 6 y 12 sobres de 1,5 gramos/sobre. Luego de adquirido dicho material fue trasladado hacia el estado Cojedes específicamente para el Laboratorio de Ingeniería y Tecnología de los Alimentos (LITA), de la Universidad Nacional Experimental de Los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora (UNELLEZ- SAN CARLOS), Vicerrectorado de Infraestructura y Procesos Industriales San Carlos– Estado Cojedes.

MATERIAL VEGETAL: *Garcinia madruno*, este fue obtenido por cosecha en la ciudad de Mantecal Estado Apure y luego llevado a la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, donde se sometió a un proceso de despulpado, tamizado, refinado y esterilizado a 121°C por 15 minutos y un enriquecimiento con lactosa.

REACTIVOS Y ADITIVOS: se incorporó al medio de cultivo hidróxido de sodio a una concentración de 0,1 Normal y ácido cítrico a una concentración de 20 por ciento, con el fin de regular y mantener las condiciones de pH del medio en los rangos óptimos establecidos por el investigador. Los reactivos fueron adquiridos en el Laboratorio de Ingeniería y Tecnología de los Alimentos (LITA), de la Universidad Nacional Experimental de Los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora (UNELLEZ- SAN CARLOS), Vicerrectorado de Infraestructura y Procesos Industriales San Carlos–Estado Cojedes. Asimismo se adicionaron suplementos vitamínicos (vitamina A, vitnatal, ferrolivel, complejo B, Metamax, clorhidrato de cisteína) y antibióticos (Clorafenicol), adquiridos en una conocida red farmacéutica a nivel nacional, con el fin de ofrecer mejores condiciones al medio de cultivo, con la incorporación de catalizadores químicos que coadyuven a sintetizar los compuestos incorporados en los diferentes sustratos y concentraciones de los mismos. En igual forma se adicionó etanol como sustancia catalizadora.

MATERIAL DE VIDRIO: se realizó una selección de los materiales empleados para el proceso de producción del *Lactobacillus casei* (Tabla 10).

Tabla 10. Materiales de vidrio

N°	Materiales	Cantidad
1	· Fiola de 250 ml.	3
2	· Fiola de 500 ml.	2
3	· Fiola de 1000 ml.	2
4	· Fiola de 200 ml.	3
5	· Fiola de 2000 ml.	1
6	· Beaker de 250 ml.	2
7	· Beaker de 1000 ml.	2
8	· Tubos de prueba de 15x 150 mm.	180
9	· Termómetro de vidrio.	2
10	· Embudos.	2
11	· Pipetas de 1 ml.	18
12	· Pipetas de 25 ml.	36
13	· Cilindros graduado 10 ml.	4
14	· Cilindros graduado 50 ml.	4
15	· Cilindros graduado 250 ml.	4
16	· Frascos para diluyentes con capacidad de 350 ml.	48
17	· Matraz de 250 ml.	1
18	· Matraz de 500 ml.	1
19	· Matraz de 1000 ml.	1
20	· Placa de Petri (100 x 15 mm).	180
21	· Bureta de 50 ml y precisión 0.1 ml.	12
22	· Varillas de vidrio.	1
23	· Recipiente del biorreactor.	1

EQUIPOS: durante esta fase se seleccionaron los equipos de acuerdo a su capacidad a fin garantizar el proceso de producción del *Lactobacillus casei* (Tabla 11).

Tabla 11. Equipos empleados en el proceso de producción de *Lactobacillus casei*

Nº	Equipos	Cantidad
1	· Autoclave. Marca Anapesing, modelo FH100.	1
2	· Balanza digital de capacidad 100 gr máximo, con sensibilidad 0,1gr. Marca Anapesing, modelo FH100.	1
3	· Balanza digital de capacidad 320 gr máximo, con sensibilidad 0,1gr. Marca Anapesing, modelo, modelo FR320.	1
4	· Baño de agua para templar y mantener el medio fundido a 40- 100°C. Marca Witeg, modelo WB-6.	1
5	· Biorreactor. Modelo New Brunswick Scientific Co. INC.	1
6	· Campana de siembra de flujo laminar vertical. Marca Lesco.	1
7	· Centrífuga. Marca Hettich, modelo universal.	1
8	· Contador de colonias digital y manual. Marca Suntex Instrument, modelo 570.	1
9	· Estufa de incubación 35–37°C. Marca Akralab, modelo 636.	1
10	· Microscopio. Marca Leica, modelo DM300.	1
11	· Nevera. Marca Lg, 12.	1
12	· Plancha de Calentamiento. Marca Corning, modelo 6795-2.	2
13	· Pro pipetas de 1-10ml.	3
14	· pH metro. Marca Hanna Instruments, modelo HI111.	1
15	· Refractómetro. Marca Mettler Toledo, Serie 30.	1

MEDIOS DE CULTIVO: para el proceso de siembra en placas y conteo del microorganismo se emplearon por tratamiento agar y caldo MRS (Tabla 12).

Tabla 12. Medios de cultivo

Nº	Medios de Cultivo	Cantidad (g)
1	· Agar DE MAN, ROGOSA Y SHARPE (MRS).	181
2	· Caldo DE MAN, ROGOSA Y SHARPE (MRS).	67,7

OBTENCIÓN DE LA BIOMASA MICROBIANA

La producción de biomasa se desarrolló en el Laboratorio de Ingeniería y Tecnología de los Alimentos (LITA), de la Universidad Nacional Experimental de Los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora (UNELLEZ-SAN CARLOS), Vicerrectorado de Infraestructura y Procesos Industriales San Carlos-Estado Cojedes. Para ello se empleo un biorreactor con capacidad de real de 2 litros y capacidad de operación de 1,5 litros (Figura 5).



Figura 5. Biorreactor y sistemas auxiliares

Una vez seleccionado y esterilizado el biorreactor se adicionaron los reactivos, aditivos, material vegetal y materiales biológicos (*Lactobacillus casei* liofilizado), este ultimo se activó en baño termostático a 37° C de operación empleando la técnica de pie de cuba, posteriormente se

ajustaron los factores experimentales para cada tratamiento (Tabla 9); cada corrida tuvo una duración de 12 horas continuas. Asimismo, durante cada tratamiento se realizaron mediciones de los sólidos solubles totales (°Brix) cada 5 minutos, análisis de crecimiento microbiano cada hora de las corridas usando la técnica de diluciones, (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}) respectivamente y siembra en placas por triplicado (Figura 6).

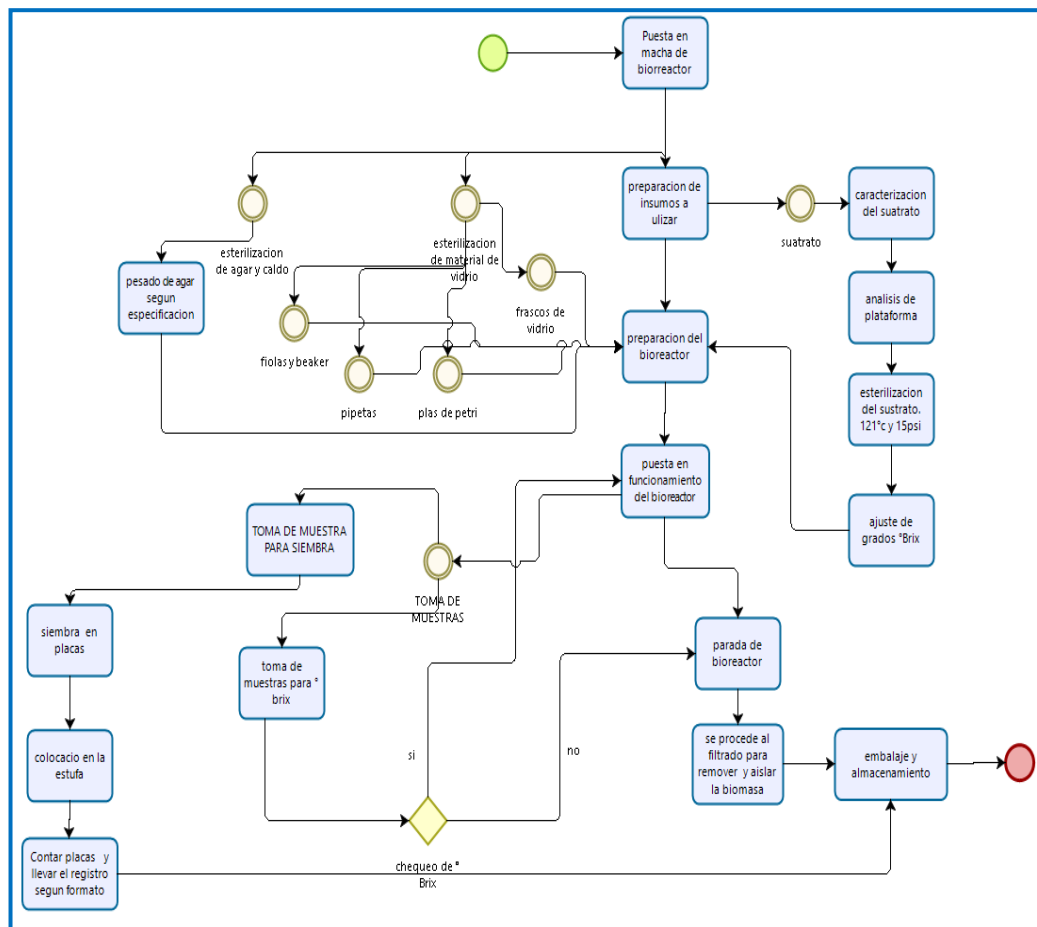


Figura 6. Flujograma de obtención de biomasa

- **Paso 2:** en esta etapa se establecieron los métodos empleados para el proceso de producción del *Lactobacillus casei*:

MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

Se prepararon los medios de cultivo agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y caldo Den Man Rogosa y Sharpe (MRS), como se establece en las normas COVENIN 1337-90, utilizando las técnicas microbiológicas para la siembra de *Lactobacillus casei* descritas en el plan de la calidad (Anexo 1).

PREPARACIÓN DE AGAR DE MAN, ROGOSA Y SHARPE (MRS):

Para la siembra se utilizó agar (MRS), preparado en función a 180 placas de Petri con 15 ml de agar, diluido por cada una, seguidamente se procedió a la dilución del agar (MRS) con agua destilada. Una vez mezclado el agar con el agua destilada según la proporción (Tabla 13), se procedió al calentamiento empleando para ello una plancha para facilitar la transferencia de calor, esto hasta que se observó un cambio en el color de la mezcla, indicando que el agar se ha disuelto totalmente en el volumen de disolvente, luego se dejó reposar y para ser vertido a razón de 15ml / tubo de ensayo.

Tabla 13. Materiales para preparación de agar

Materiales	Unid	cantidad
Agar MRS Rendimiento 67,15g/l	g	181
Agua destilada	L	2,7

Posteriormente los tubos de ensayo fueron esterilizados empleando el autoclave a 121° C y 15 Psi por 15 min. Luego de ser esterilizado dicho medio se enfría hasta una temperatura aproximada de 45–50 °C, seguidamente se procedió a acondicionar y homogenizar cuidadosamente el medio, se dejó enfriar para después agregar asépticamente el mismo en las placas. Cuando se procede a sembrar en superficie se colocan los tubos

de ensayo en baño termostático a 100 °C, y se dejan enfriar a una temperatura de 37 °C para verterlos en las placas de Petri.

PREPARACIÓN DEL CALDO DE MAN, ROGOSA Y SHARPE (MRS)

El caldo de (MRS), fue utilizado para la preparación de las diluciones de las muestras a sembrar, con el objetivo de lograr cuantificar las unidades formadoras de colonias (ufc) presentes para dicha muestra. Este medio se empleó a una concentración de 1 % (1 gr / 100 ml) de acuerdo a lo establecido en la norma COVENIN 1337-90.

Para cada concentración de lactosa se preparó el caldo (MRS), contabilizando un total de 45 frascos de vidrio con 90 ml caldo cada uno y 15 frascos de vidrio con 180 ml caldo (MRS) (Tabla 14).

Tabla 14. Materiales para preparación de caldo

Materiales	Unid	cantidad
Caldo MRS Rendimiento 10g/l	g	67,5
Agua destilada	L	6,75

Una vez pesada la cantidad de caldo (MRS) a utilizar y el volumen de solvente a emplear, al igual que para el agar se realizó un calentamiento a través de una plancha para facilitar el intercambio calor, hasta observar un color traslucido (amarillo), se dejó reposar y con la ayuda de un cilindro graduado fue vertido en recipientes de vidrio, para así ser introducidos en el autoclave para su esterilización, luego de la esterilización tanto el agar como el caldo se deben conservar bajo refrigeración con el fin de mantener la esterilidad en los medios hasta el momento de su utilización.

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO (*Garcinia madruno*)

- Se realizó el proceso de obtención de la pulpa del *Garcinia madruno* (Figura 7) y el agua producto de la misma, se le aplicó un proceso de filtrado, con la finalidad de que no contengan residuos o precipitados, se envasa en recipientes de vidrio para pasar a la siguiente etapa.

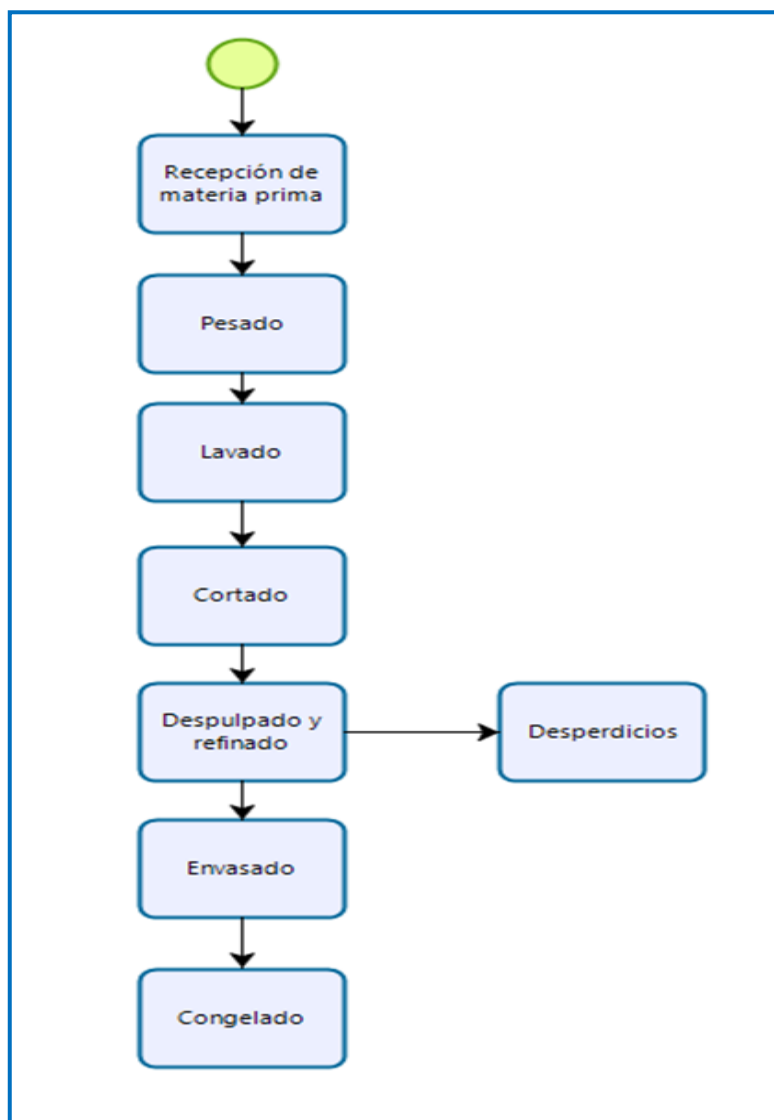


Figura 7. Flujograma para la obtención de la pulpa de *Garcinia madruno*

- Esterilización: aplicación de 121 °C y presión de 15l Psi por 15 minutos con la finalidad de eliminar microorganismos no deseados en el medio,

luego de ello se dejó reposar hasta llegar a la temperatura ambiente, con el fin de bajar la temperatura adquirida durante el proceso de esterilización y aplicar un proceso de refrigeración manteniendo los recipientes con el contenido estéril.

- Reposo: durante esta etapa se produce una precipitación de las partículas no deseadas en el medio, para esto se realizó asépticamente un segundo filtrado.
- Acondicionamiento final: asépticamente se midieron el volumen o “batch” a utilizar (1500 ml), los sólidos solubles totales (°Brix), posteriormente se enriqueció y adicionaron los componentes vitamínicos, minerales, porcentaje de lactosa y el resto de los componentes que forman parte de la formulación del sustrato, finalmente se procedió a la activación del microorganismo en el sustrato (pie de cuba).

PREPARACIÓN DEL INÓCULO (PIE DE CUBA)

Consistió en dar las condiciones necesarias de tal manera de activar el microorganismo (*Lactobacillus casei*) tomando en cuenta los requerimiento (nutrientes) de las células por lo cual se deben adaptar a las condiciones del sustrato antes de ser incorporadas en el recipiente del equipo.

- Se tomó 250 ml del total del sustrato enriquecido en una fiola de 500 ml de capacidad, se agregó el microorganismo liofilizado y se llevó la fiola a baño termostático hasta alcanzar una temperatura de 37 °C, a partir de ese momento se comenzó a registrar 15 minutos, luego de este lapso de tiempo la cepa se activó y el inóculo posee las condiciones para metabolizar los nutrientes suspendidos en el medio de cultivo.

- Se agitó durante los 15 minutos a baño termostático a 37 °C, esto con la finalidad de que el microorganismo no se vea afectado por el cambio de temperatura de un medio a otro básicamente, las temperaturas del inóculo y el medio de cultivo deben ser relativamente iguales.
- Se agregó asépticamente al recipiente del equipo (bioreactor) empleando un embudo de vidrio, a partir de ese momento se inició la corrida y se tomó todos los registros de las condiciones inicio (tiempo de inicio, temperatura, pH, velocidad de agitación (Rpm), velocidad de aireación (Cfm), sólidos solubles totales (°Brix)).

Una vez preparados los medios de cultivo y la concentración de lactosa, al igual que todo el material de vidrio a utilizar se da inicio al proceso de fermentación. En los siguientes pasos:

- Se agregó el sustrato al recipiente de vidrio estéril del biorreactor, batch 1,5 litros, separando del volumen total del sustrato 250 ml para la preparación del inóculo.
- Se encendió el equipo, con el fin de estabilizar la temperatura, pH, agitación y velocidad de aireación, todos ellos factores óptimos para el crecimiento y desarrollo del microorganismo (*Lactobacillus casei*).
- Simultáneamente se activó el microorganismo (pie de cuba) en una fiola de 500 ml a una temperatura de 37 °C con agitación antes de agregarla al recipiente del equipo biorreactor.
- Una vez activado el microorganismo y estabilizadas las condiciones del biorreactor, se incorporó el inóculo al sustrato.

- Las condiciones de operación se encuentran descritas en la tabla 9. Estas condiciones son variables, fijas, controladas de forma continua a lo largo del proceso.

Al iniciarse el proceso se procedió a la toma de las muestras, realizadas en intervalos de tiempo de 1 hora, desde la hora de inicio hasta la hora final. Esta toma de muestra consistió en extraer 25 ml del sustrato acondicionado inoculado con una pipeta de 25 ml estéril y agregando 20 ml en un frasco con 180 ml de caldo (MRS) y de esta manera se obtiene la dilución 10^{-1} (v/v), debidamente homogenizada. Posteriormente se preparó la dilución 10^{-3} (v/v), tomando 1 ml de la dilución anterior para añadirlo en un frasco con 90 ml de agua caldo (MRS) previamente preparada y esterilizada. De igual manera se continúan preparando las diluciones 10^{-5} (v/v), 10^{-7} (v/v).

Luego de preparar todas las diluciones se continuó con la siembra en placas de Petri, la misma se realizó en profundidad y consistió en agregar 0.1 ml de la dilución correspondiente para luego agregar el agar (MRS) previamente fundido y enfriado. La siembra se realizó en el siguiente orden: 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} , 10^{-1} (v/v), y por triplicado. Finalmente se incubaron las placas en una estufa de incubación a 37 °C por 5 días.

RECUESTO EN PLACAS

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

$$UFC = N^{\circ}C * 1/Dilc. \quad (1)$$

Con la aplicación de la ecuación se determinó el número de colonias a un tiempo determinado.

CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE ETANOL

Para este cálculo se utilizó la ecuación planteada por Gay – Lussac, basada en el porcentaje de alcohol y gas carbónico presente en una molécula de azúcar:

$$1 \text{ molécula de azúcar es } = a \text{ 0,54 de alcohol } + 0,4816 \text{ gas carbónico} \quad (2)$$

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se estimó la producción de etanol por cada hora de proceso de la siguiente manera:

$$\text{Etanol} = (^{\circ} \text{Brix I} - ^{\circ} \text{Brix F}) * 0.54 \quad (3)$$

Fase III: Optimización vía simulación de las condiciones operativas del proceso de producción del *Lactobacillus casei* empleando como sustrato *Garcinia madruno*. Para ello, se aprovechó la versatilidad del 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, para determinar los términos del modelo de alto orden más importantes que permiten explicar cada respuesta, empleando para ello el 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 técnica 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: Determinación de la eficiencia productiva empleando el método no paramétrico DEA (Data envelopment analysis). En esta etapa de la investigación se utilizó como herramienta DEA (Análisis Envolverte de Datos), y el conjunto de datos obtenidos fue procesado mediante el uso de métodos numéricos con el software Análisis Frontier Banxia a fin de determinar la eficiencia relativa a diferentes concentraciones del *Garcinia madruno* y aplicar los criterios establecidos por Farrell (1957), que permiten establecer la eficiencia productiva como función del uso más adecuado de los recursos que generan una mayor producción. En este propósito, el software emplea módulos de comparación de los diferentes tratamientos del experimento, colocando las entradas y las salidas para su rendimiento. Asimismo, para la selección de dichas entradas y salidas se tomó en consideración los supuestos descritos por Dyson *et al.*, (2001) que contemplan que las mismas cubran toda la gama de recursos utilizados, capturen todos los niveles de actividad y medidas de rendimiento, que el conjunto de factores sean comunes a todas las unidades, las variaciones del entorno sean evaluadas y consideradas, si es necesario, a fin de que el DEA brinde resultados adecuados, que reflejen el comportamiento de las unidades comparadas (tratamientos).

Fase V: Documentación y presentación de resultados. En esta fase de la investigación se procedió al análisis de los resultados a fin de establecer las conclusiones del tema en estudio.

RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

En esta etapa de la investigación se presenta el desarrollo del esquema metodológico propuesto en el capítulo anterior, empleando para ello los principios científicos de forma ordenada, a fin de evaluar la eficiencia del *Garcinia madruno* como contribución en la producción efectiva de biomasa de *Lactobacillus casei*. En ese mismo sentido, en primer lugar se exhibe la caracterización física, química y microbiológica del sustrato *Garcinia madruno*. Seguidamente, se muestra el diseño de arreglo de tratamientos óptimos de Hipercubo Latino escalable para el proceso de producción *Lactobacillus casei*. Posteriormente se optimiza vía simulación las condiciones operativas del proceso de producción del *Lactobacillus casei* empleando como sustrato *Garcinia madruno*. Luego, se presenta la determinación de la eficiencia productiva, centrada en el uso correcto de determinados recursos (entradas) con el fin de obtener con ellos la máxima producción de biomasa de *Lactobacillus casei* (salida).

Caracterización física, química y microbiológica del sustrato *Garcinia madruno*.

El fruto de *Garcinia madruno* tiene forma ovoidea, con pericarpio cubierto de espinas, no punzantes, de color amarillo verdoso a amarillo, cuando está maduro, posee una (1) a dos (2) semillas grandes, cubiertas por una pulpa blanca, de sabor agridulce muy agradable. La masa del fruto maduro oscila de 30 a 60 g. La pulpa tiene aproximadamente entre 70 a 80 % en masa de jugo que tiene una densidad aproximada de 1,04 g/ml.

Asimismo, se determinó el porcentaje de proteína por medio del método de Kjeldahl (COVENIN 1195-80), el cual consistió en digerir las proteínas y otros componentes orgánicos de la pulpa del fruto en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores, permitiendo obtener un valor en porcentaje de 6,66 (ver tabla 15) que para el desarrollo del microorganismo es importante porque interviene en la formación de su pared celular.

En igual forma, en la tabla que se muestra a continuación se observan los resultados de los análisis químicos y microbiológicos realizados a la pulpa de *Garcinia madruno* en el LITA (Laboratorio de Investigación y Tecnología de Alimentos de la UNELLEZ) evidenciando características importantes para el desarrollo del microorganismo *Lactobacillus casei*.

Tabla 15. Caracterización química y microbiológica de la pulpa de *Garcinia madruno*

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Típica.
Acidez (%)	3	19,071	19,072	19,072	±0,000577
Aw (%)	3	0,996	0,999	0,998	±0,001528
SST (^a Brix)	3	7,900	8,000	8	±0,057735
Cenizas (%)	3	2,059	2,060	2,06	±0,000577
Grasa (%)	3	1,480	1,490	1,49	±0,005774
Humedad (%)	3	89,400	89,440	89,42	±0,020000
pH	3	3,860	3,870	3,86	±0,005774
Proteína (%)	3	6,660	6,670	6,66	±0,005774
Materia seca (%)	3	11,610	11,615	11,61	±0,002887
Nitrógeno total (%)	3	2,32	2,33	2,33	±0,005774
Coliformes total (ufc)	3	0	0	0	0
Coliformes fecal (ufc)	3	0	0	0	0
N válido (según lista)	3				

N=Numero de repeticiones

En la tabla 15, se observa que la pulpa de *Garcinia madruno* empleada es ácida; con un valor de pH de 3,86 el cual se considera aceptable para realizar la experimentación, sin embargo al momento de ser introducida en el biorreactor se le agrego hidróxido de sodio con la finalidad de acondicionar el sustrato y aumentar el pH.

Por su parte, el contenido de azúcares totales reportó un valor un poco bajo (8 ° Brix) comparado con el obtenido por Ruíz (2014), esta discrepancia puede deberse en gran medida al nivel de incidencia de la luz solar, la condición geográfica (altitud menor a 300 m sobre el nivel del mar) y la acidez de los suelos propias de la zona del Alto Apure (Región Llanera Venezolana), no obstante la cantidad presente se considera suficiente para contribuir con el desarrollo del microorganismo.

El valor de la humedad presente en la pulpa utilizada es muy similar al reportado por Chávez *et al*, (2012) en su investigación en la Amazonía de Bolivia (82,1 por ciento) y ligeramente mayor comparado con el indicado por Ruíz (2014) en frutos procedentes de España (71,9 por ciento), sin embargo esta diferencia en cuanto a su contenido acuoso, podría deberse al lugar y las distintas condiciones ambientales en el momento de recolección, como la disponibilidad de agua, luz solar y la exposición al viento, lo que contribuye a la desecación de los frutos; en tal sentido, este parámetro ha demostrado que su valor depende en gran medida de las condiciones climáticas y que su presencia en el sustrato favorece el crecimiento del *Lactobacillus casei*, debido a que la mayoría de los microorganismos necesitan gran cantidad de agua libre para desarrollar en mejor condición sus actividades.

Con respecto al contenido de cenizas el estudio mostró un valor cercano al obtenido por Chávez *et al*, (2012), de lo que se puede inferir que al realizar el análisis de macro y microelementos, la pulpa presente algunos contenidos de minerales (K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn) propios de los frutos de su especie (Özcan y Haciseferogullari, 2007).

Asimismo, el estudio mostró que el porcentaje de proteína es cercano a los valores encontrados por Chávez *et al*, (2012), alto con respecto a los obtenidos por Ruíz (2014) y muy altos para una fruta considerando que la literatura indica que las mismas son deficientes de proteínas (0,2 – 1,3 %) (Kirk *et al.*, 1996), pero podría justificarse teniendo presente que para determinar la cantidad de proteínas

a partir del contenido de nitrógeno, se utilizó el factor 6,25 que supone que muchas de la proteínas contienen ciertos porcentajes de nitrógeno, aun cuando la realidad es que, según la naturaleza del producto, una fracción considerable del nitrógeno procede de otros componentes nitrogenados y tendría que determinar en cada caso el factor que se debe emplear (Adrian *et al.*, 2000).

En lo que respecta, a los análisis microbiológicos realizados a la pulpa, no se encontró presencia coliformes totales, fecales y aerobios mesofilos, de lo que se infiere que el proceso de despulpado se ejecutó siguiendo las normas de buenas prácticas de manufactura.

Diseño de arreglo de tratamientos óptimos de hipercubo latino escalable para el proceso de producción *Lactobacillus casei*.

En la tabla 16, se observa la matriz “D” de diseño de muestreo utilizada para la recolección de la información y modelación del proceso de producción del microorganismo *Lactobacillus casei* en forma efectiva. 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, el crecimiento del *Lactobacillus casei* se puede ver afectado por diferentes factores, tanto nutricionales como físicos (medioambientales) entre los que se encuentran los niveles de sustrato (fuentes de carbono y nitrógeno), el tipo de fermentación, el pH, la temperatura, la formación de subproductos, entre otros.

Tabla 16. Matriz de diseño de tratamientos y respuestas tecnológicas medidas para concentración de biomasa, concentración de etanol y sólidos solubles totales: Diseño Hipercubo Latino

NºTrat.	Factores Experimentales							Respuesta		
	X1 pH	X2 °T(°C)	X3 %sustrato	X4 %lactosa	X5 agitación RPM	X6 Aereación cfm	X7 Tiempo (h)	Y1 Ufc/ml	Y2 Etanol	Y3 °Brix
1	4,8	36	72	16	262	2,2	8,3	1,17E+07	2,717	8,757
2	4,6	36	84	19	261	1,4	12	1,27E+08	1,668	8,948
3	4,8	33	74	21	246	2	11	7,19E+07	1,976	8,491
4	4,4	37	83	24	237	1,5	14	2,14E+08	1,162	9,102
5	4,9	34	81	21	267	1,8	9,1	3,19E+07	2,133	8,38
6	5,3	33	83	21	224	1,9	12	1,08E+08	1,612	8,738
7	5,4	35	90	15	243	1,4	12	1,23E+08	1,587	9,192
8	5	31	83	21	192	1,2	9,8	1,34E+08	1,213	7,532
9	4,9	38	75	16	252	1,6	11	1,30E+08	2,37	9,379
10	4,6	31	84	23	254	1,6	10	5,89E+07	1,337	7,764
11	4,8	33	79	11	244	1,8	12	5,50E+07	1,77	8,89
12	4,3	36	77	24	255	2	12	1,19E+08	1,693	8,863
13	5,1	35	88	22	263	1,5	11	1,17E+08	1,747	8,907
14	4,8	37	80	15	252	1,9	13	1,30E+08	1,818	9,685
15	5,2	34	83	19	240	1,9	12	9,03E+07	1,797	9,031
16	4,8	38	75	17	235	1,5	9,2	8,58E+07	2,298	8,769
17	4,9	33	81	11	258	1,6	11	4,90E+07	1,825	8,693
18	4,5	34	78	19	229	1,6	11	1,11E+08	1,553	8,332
19	4,9	35	77	22	218	2,1	11	1,07E+08	1,799	8,876
20	4,9	35	77	23	247	1,6	11	1,46E+08	1,855	8,731
21	4,8	35	86	21	215	1,9	11	8,36E+07	1,47	8,622
22	5,3	32	77	16	275	2,3	9,3	5,86E+06	2,728	8,978
23	5,3	33	78	27	236	1,7	11	1,46E+08	1,844	8,543
24	5	37	82	13	246	1,5	9,6	5,85E+07	2,195	8,95
25	4,7	35	86	16	226	2,1	13	9,23E+07	1,387	9,345
26	5,1	30	82	25	236	1,6	12	1,35E+08	1,264	8,086
27	5,1	37	77	18	201	1,9	8,6	6,21E+07	2,302	8,727
28	5,2	35	77	20	265	1,7	9,9	8,80E+07	2,322	8,765

Por su parte en lo que respecta al crecimiento microbiano en la Figura 8, se observó que al comparar los tratamientos 1, 3, 9 y 16 en función a los parámetros

máxima concentración de biomasa y tiempo máximo en alcanzar la misma, existe evidencia significativa de que el tratamiento 9 (75 por ciento de sustrato enriquecido con 16 por ciento de lactosa), es el que presenta mayor cantidad de biomasa al ubicarse en un valor de $1,30 \times 10^8$ Ufc/ml, la cual fue lograda en un tiempo de 6 h.

Asimismo, se pudo apreciar que para dicho tratamiento, la fase de adaptación se ubicó entre la hora 0 y 2, para luego pasar a la fase de crecimiento exponencial entre la hora 2 y 6 a fin de dar inicio a las actividades metabólicas captando enseguida los nutrientes presentes en el *Garcinia madruno*, así como el oxígeno necesario para su reproducción, a su vez entre la hora 6 y 7 se inicia la fase estacionaria; en la hora 7 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.

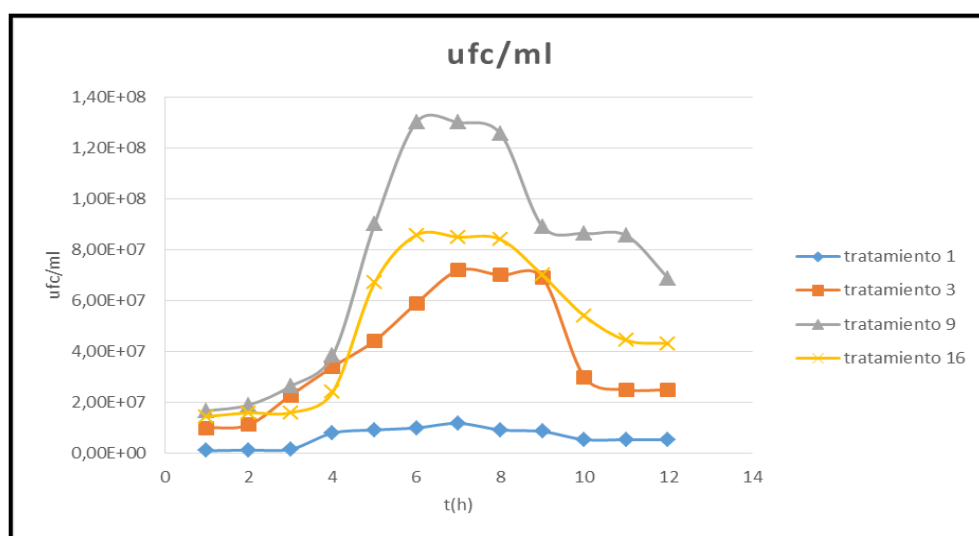


Figura 8. Concentración de Biomasa de *Lactobacillus casei* (Ufc/ml) con *Garcinia madruno* vs. Tiempo (h) para los tratamientos 1, 3, 9 y 16.

De igual manera en la Figura 9, se observa que al comparar los tratamientos 22, 28, 27 y 12 en función a los parámetros máxima concentración de biomasa y tiempo máximo en alcanzar la misma, que existe evidencia significativa de que el tratamiento 12 (77 por ciento de sustrato enriquecido con

24 por ciento de lactosa), es el que presenta mayor cantidad de biomasa al ubicarse en $1,19 \times 10^8$ Ufc/ml, la cual fue lograda en un tiempo de 7 h.

Adicionalmente, se pudo apreciar que, la fase de adaptación se ubicó entre la hora 0 y 3, para dar paso a la fase de crecimiento exponencial, entre la hora 3 y 7, a fin de dar inicio a las actividades metabólicas captando enseguida los nutrientes presentes en el *Garcinia madruno*, así como el oxígeno necesario para su reproducción; a su vez entre la hora 7 y 7,5 se inicia la fase estacionaria, donde se presenció ausencia del crecimiento por agotamiento de nutrientes y acumulación de sustancias tóxicas. Posteriormente, en la hora 7,5 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.

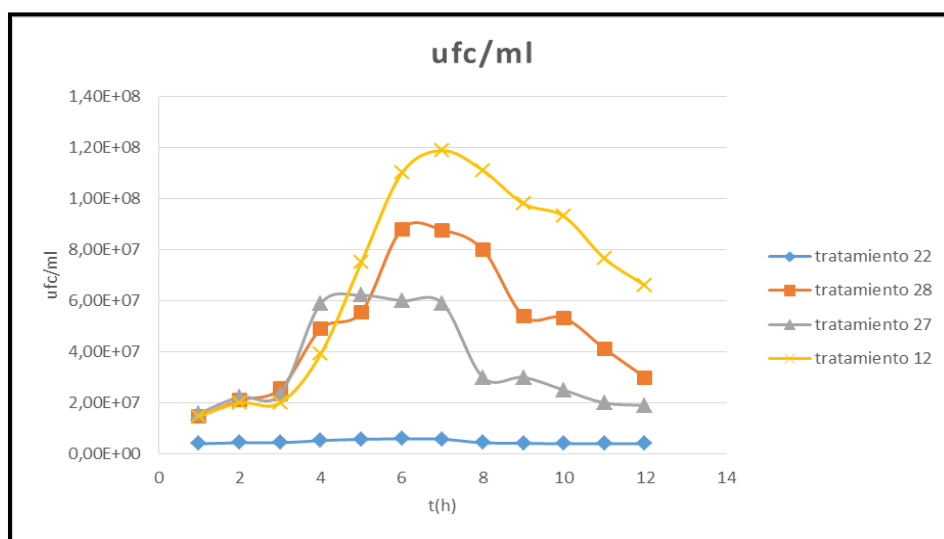


Figura 9. Concentración de Biomasa de *Lactobacillus casei* (Ufc/ml) con *Garcinia madruno* vs. Tiempo (h) para los tratamientos 12, 22, 27 y 28.

Asimismo, en la Figura 10, se muestra que al comparar los tratamientos 18, 19, 20 y 23 en función a los parámetros máxima concentración de biomasa y tiempo máximo en alcanzar la misma, el tratamiento 23 (78 por ciento de sustrato

enriquecido con 27 por ciento de lactosa), es el que presenta mayor producción de biomasa al situarse en $1,47 \times 10^8$ Ufc/ml, la cual fue lograda en un tiempo de 8 h.

Además, se observa con certeza que para dicho tratamiento, la fase de adaptación se ubicó entre la hora 0 y 2, para luego pasar a la fase de crecimiento exponencial entre la hora 2 y 8 a fin de dar inicio a las actividades metabólicas captando enseguida los nutrientes presentes en el *Garcinia madruno*, así como el oxígeno necesario para su reproducción, a su vez entre la hora 8 y 8,5 se inicia la fase estacionaria; en la hora 8,5 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.

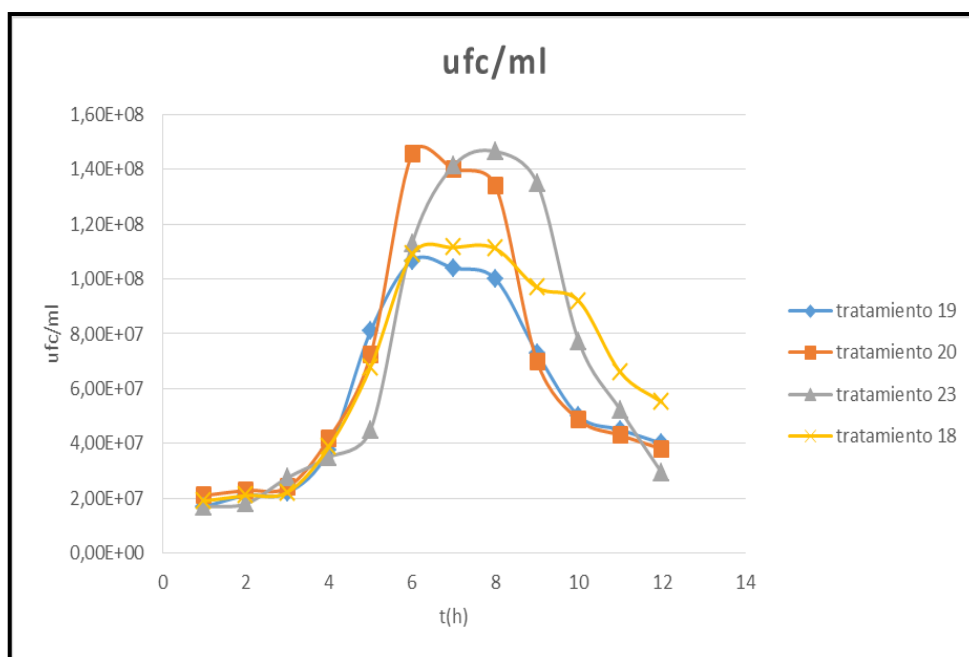


Figura 10. Concentración de Biomasa de *Lactobacillus casei* (Ufc/ml) con *Garcinia madruno* vs. Tiempo (h) para los tratamientos 18, 19, 20 y 23.

En igual forma, en la Figura 11, se muestra que al comparar los tratamientos 5, 11, 14 y 17 en función a los parámetros máxima concentración de biomasa y tiempo máximo en alcanzar la misma, el tratamiento 14 (80 por ciento de sustrato enriquecido con 15 por ciento de lactosa), es el que presenta mayor

producción de biomasa al situarse en $1,30 \times 10^8$ Ufc/ml, la cual fue lograda 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 2, para luego pasar a la fase de crecimiento exponencial entre la hora 2 y 7 a fin de dar inicio a las actividades metabólicas captando enseguida los nutrientes presentes en el *Garcinia madruno*, así como el oxígeno necesario para su reproducción, a su vez entre la hora 7 y 8 se inicia la fase estacionaria; en la hora 8 se da comienzo a 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.

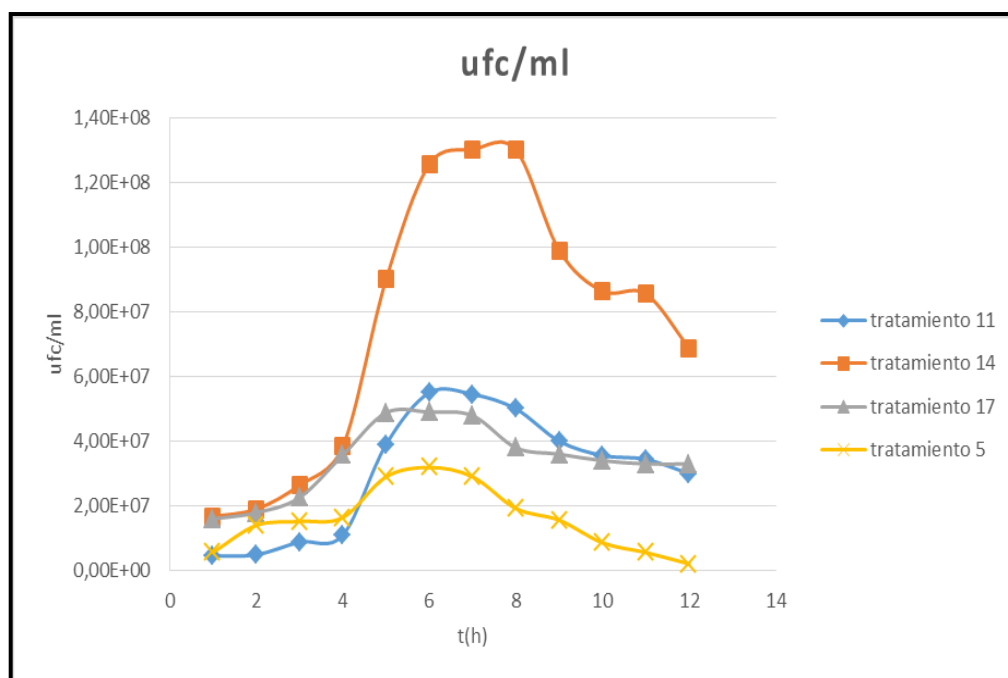


Figura 11. Concentración de Biomasa de *Lactobacillus casei* (Ufc/ml) con *Garcinia madruno* vs. Tiempo (h) para los tratamientos 5, 11, 14 y 17.

Igualmente, en la Figura 12, se muestra que al comparar los tratamientos 4, 8, 24 y 26 en función a los parámetros máxima concentración de biomasa y tiempo máximo en alcanzar la misma, el tratamiento 4 (83 por ciento de sustrato

enriquecido con 24 porciento de lactosa), es el que presenta mayor producción de biomasa al situarse en $2,14 \times 10^8$ Ufc/ml, la cual fue lograda 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 2, para luego pasar a la fase de crecimiento exponencial entre la hora 2 y 7 a fin de dar inicio a las actividades metabólicas captando enseguida los nutrientes presentes en el *Garcinia madruno*, así como el oxígeno necesario para su reproducción, a su vez entre la hora 7 y 8 se inicia la fase estacionaria; en la hora 8 se da comienzo a 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.

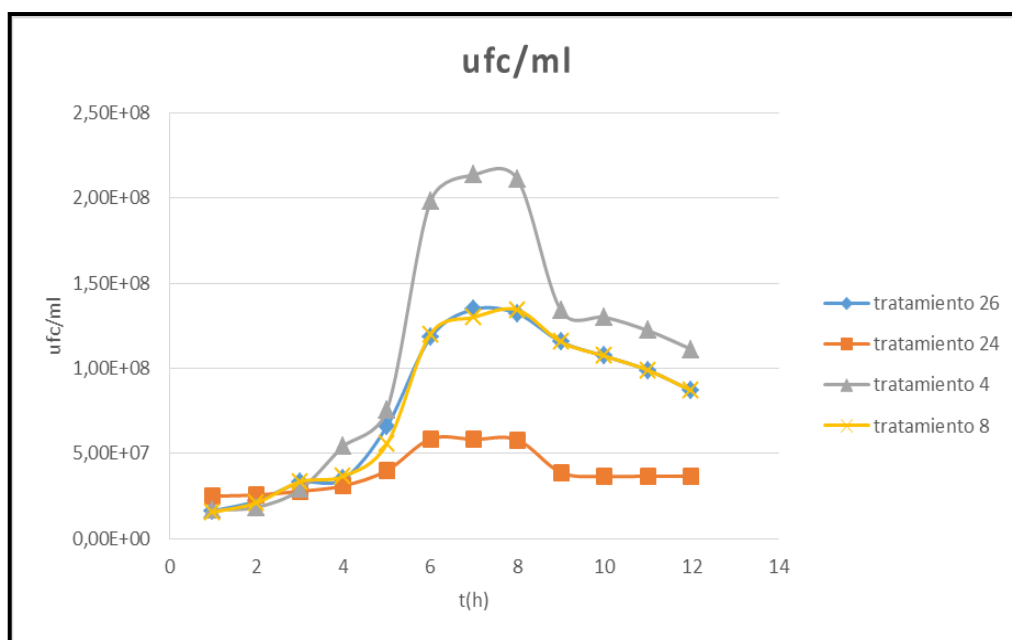


Figura 12. Concentración de Biomasa de *Lactobacillus casei* (Ufc/ml) con *Garcinia madruno* vs. Tiempo (h) para los tratamientos 4, 8, 24 y 26.

Igualmente, en lo que respecta al crecimiento microbiano en la Figura 13, se observó que al comparar los tratamientos 2, 6, 10 y 15 en función a los parámetros máxima concentración de biomasa y tiempo máximo en alcanzar la misma, existe evidencia significativa de que el tratamiento 2 (84 por ciento de sustrato enriquecido con 19 por ciento de lactosa), es el que presenta mayor

cantidad de biomasa al ubicarse en $1,27 \times 10^8$ Ufc/ml, la cual fue lograda en un tiempo de 7 h.

Asimismo, se pudo apreciar que para dicho tratamiento, la fase de adaptación se ubicó entre la hora 0 y 2, para luego pasar a la fase de crecimiento exponencial entre la hora 2 y 7 a fin de dar inicio a las actividades metabólicas captando enseguida los nutrientes presentes en el *Garcinia madruno*, así como el oxígeno suministrado necesario para su reproducción, a su vez entre la hora 7 y 8 se inicia la fase estacionaria; en la hora 8 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.

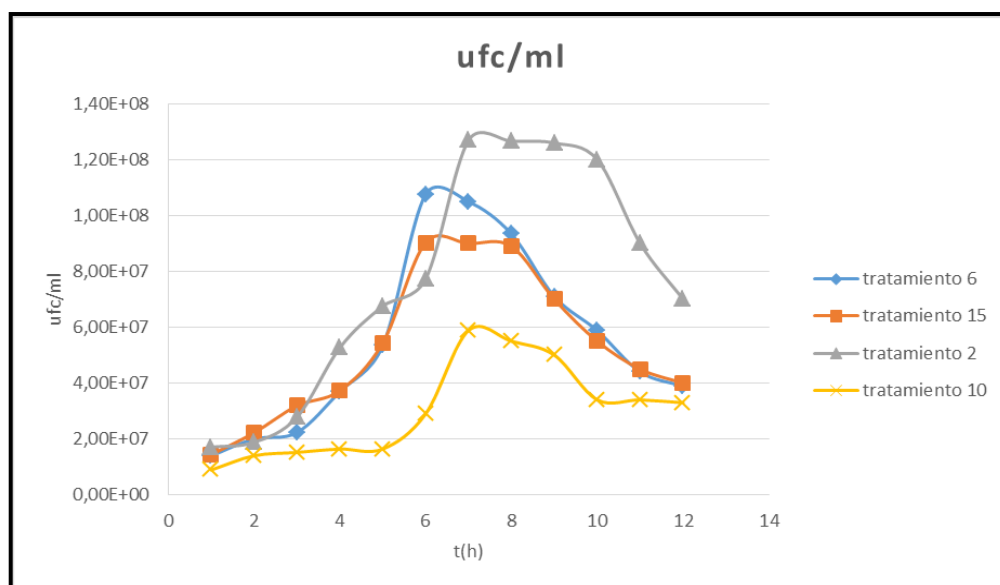


Figura 13. Concentración de Biomasa de *Lactobacillus casei* (Ufc/ml) con *Garcinia madruno* vs. Tiempo (h) para los tratamientos 2, 6, 10 y 15.

Adicionalmente, en la Figura 14, se muestra que al comparar los tratamientos 7, 13, 21 y 25 en función a los parámetros máxima concentración de biomasa y tiempo máximo en alcanzar la misma, el tratamiento 7 (90 por ciento de sustrato enriquecido con 15 por ciento de lactosa), es el que presenta mayor

producción de biomasa al situarse en $1,23 \times 10^8$ Ufc/ml, la cual fue lograda en un tiempo de 9 h.

Además, se observa con certeza que para dicho tratamiento, la fase de adaptación se ubicó entre la hora 0 y 2, para luego pasar a la fase de crecimiento exponencial entre la hora 2 y 9 a fin de dar inicio a las actividades metabólicas captando enseguida los nutrientes presentes en el *Garcinia madruno*, así como el oxígeno necesario para su reproducción, a su vez entre la hora 9 y 10 se inicia la fase estacionaria; en la hora 10 se da comienzo a 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.

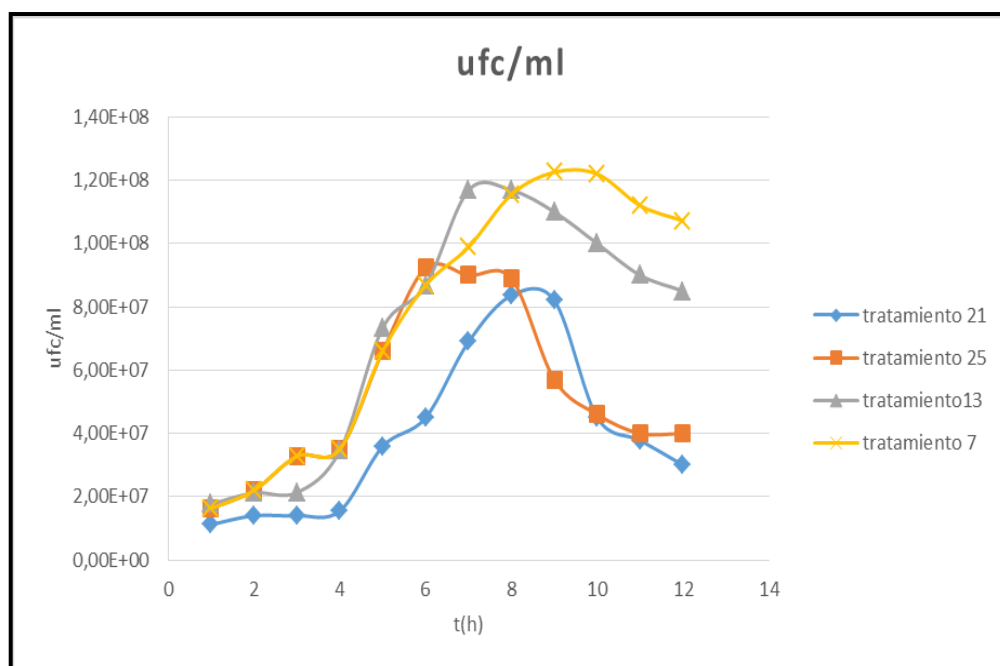


Figura 14. Concentración de Biomasa de *Lactobacillus casei* (Ufc/ml) con *Garcinia madruno* vs. Tiempo (h) para los tratamientos 7, 13, 21 y 25.

En líneas generales el comportamiento de la biomasa evidenció que la pulpa de *Garcinia madruno* enriquecida con lactosa, puede ser considerada un excelente medio de cultivo para el *Lactobacillus casei*, debido a que permite suplir sus requerimientos nutricionales, proporcionando grandes ventajas en

cuanto a costos, al emplear un sustrato no convencional poco explotado a nivel industrial, económico y que puede llegar a generar un elevado crecimiento microbiano de $2,14 \times 10^8$ Ufc/ml. En este propósito, la composición nutricional que presenta el *Garcinia madruno*, lo potencian como un sustrato apto para el desarrollo eficiente de dicho microorganismo, lo cual se debe en gran parte a su riqueza en minerales, azúcares (fructosa) y proteínas que favorecen la formación de la pared celular del *Lactobacillus casei*, permitiéndole de esta forma ser tan efectivo como un medio convencional.

Optimización vía simulación las condiciones operativas del proceso de producción del *Lactobacillus casei* empleando como sustrato *Garcinia madruno*.

Para el modelamiento (ajuste de parámetros de un modelo para cada respuesta) se utilizó 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 diagnosticar que 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:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i \neq j}^j \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon \quad (4)$$

En ese mismo sentido, el modelo para 07 (siete) factores experimentales, tendrá la siguiente estructura (treinta y seis coeficientes regresores y un término independiente β_0):

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{55} X_5^2 + \beta_{66} X_6^2 + \beta_{77} X_7^2 + \beta_{12} X_1 X_2 +$$

$$\begin{aligned} & \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{14}X_1X_4 + \beta_{15}X_1X_5 + \beta_{16}X_1X_6 + \beta_{17}X_1X_7 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{24}X_2X_4 + \\ & \beta_{25}X_2X_5 + \beta_{26}X_2X_6 + \beta_{27}X_2X_7 + \beta_{34}X_3X_4 + \beta_{35}X_3X_5 + \beta_{36}X_3X_6 + \beta_{37}X_3X_7 + \beta_{45}X_4X_5 + \\ & \beta_{46}X_4X_6 + \beta_{47}X_4X_7 + \beta_{56}X_5X_6 + \beta_{57}X_5X_7 + \beta_{67}X_6X_7 + \beta_{1234567}X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7 + \\ & \varepsilon_i \end{aligned} \quad (5)$$

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 realizaron 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 15, 16 y 17, se visualizan los términos importantes en el modelo (términos destacados en franja oscura).

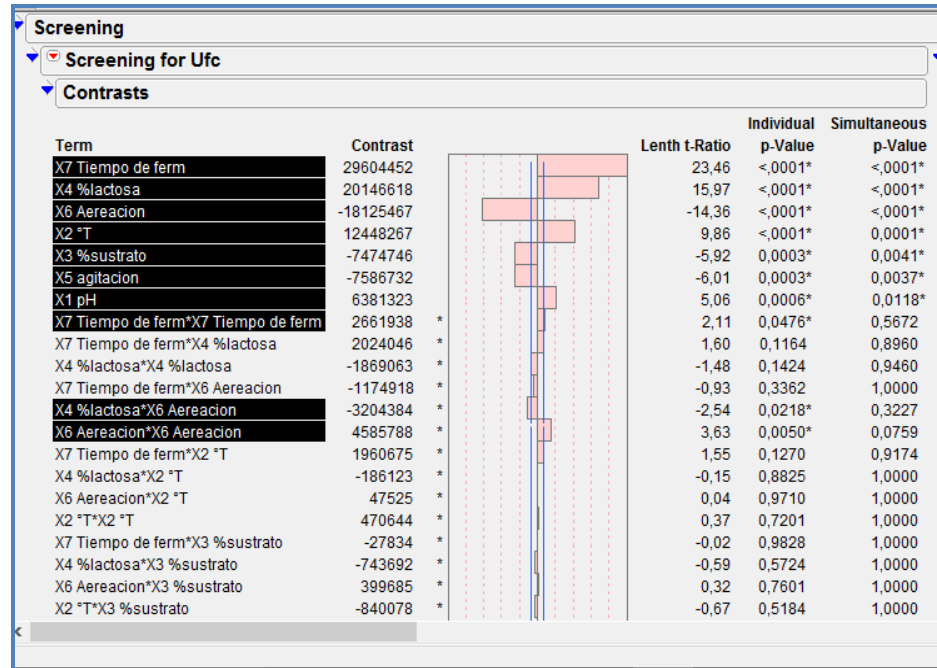


Figura 15. Contraste para la respuesta Y_1 : Concentración de biomasa

En la figura 15, se observa el análisis screening para la variable concentración de biomasa (Ufc/ml), indicando que los únicos términos que no son capaces de explicar la variabilidad de la respuesta cantidad de biomasa debido a su nivel de significancia, son: X_7X_4 , X_4^2 , X_7X_6 , X_7X_2 , X_4X_2 , X_6X_2 , X_2^2 , X_7X_3 , X_4X_3 , X_6X_3 , X_2X_3 , por lo que el modelo suficiente para la variable respuesta Y_1 (concentración de biomasa), contiene la siguiente estructura:

$$Y_1 = f(X_7, X_4, X_6, X_2, X_3, X_5, X_1, X_7^2, X_4X_6, X_6^2) \quad (6)$$

En la figura 16, que se muestra a continuación para la variable concentración de etanol (g/l), se observa que los términos que no son capaces de explicar la variabilidad de la respuesta debido a su nivel de significancia son: X_7^2 , X_7X_3 , X_3^2 , X_7X_5 , X_3X_5 , X_7X_1 , X_3X_1 , X_5X_1 , X_1^2 , X_7X_2 , X_3X_2 , X_5X_2 , X_1X_2 , por lo que el modelo suficiente para la variable respuesta Y_2 (concentración de etanol), contiene la siguiente estructura:

$$Y_2 = f(X_7, X_3, X_5, X_1, X_2, X_6, X_4, X_5^2) \quad (7)$$

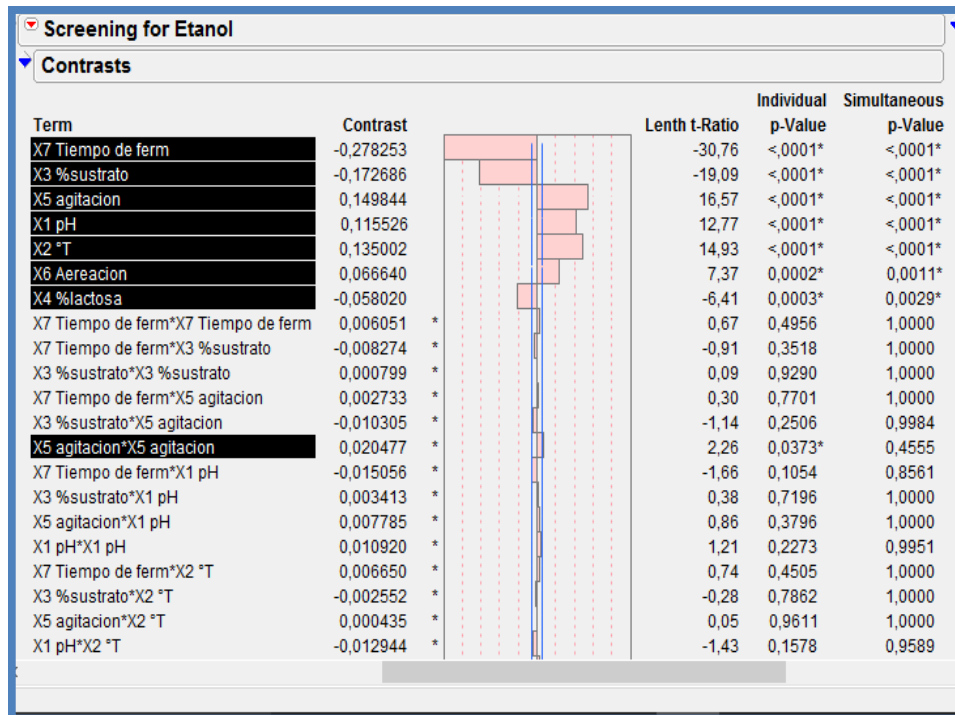


Figura 16. Contraste para la respuesta Y₂: Concentración de etanol

En la figura 17, que se muestra a continuación para el caso de Solidos solubles totales (°Brix), los únicos términos que no son capaces de explicar el modelo son: X_3 , X_2^2 , X_7^2 , X_7X_1 , X_1^2 , X_2X_6 , X_7X_6 , X_1X_6 , X_6^2 , X_2X_4 , X_7X_4 , X_1X_4 , X_6X_4 , por lo que contiene la siguiente estructura:

$$Y_3 = f(X_2, X_7, X_1, X_6, X_4, X_5, X_2X_7, X_2X_1) \quad (8)$$

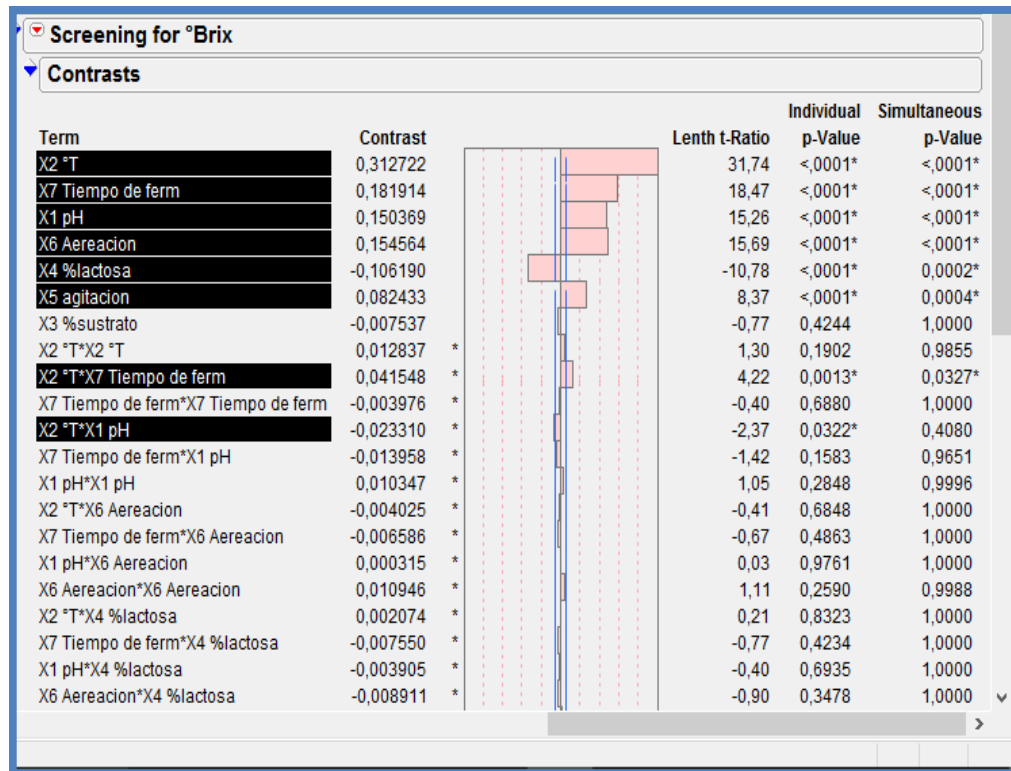


Figura 17. Contraste para la respuesta Y₃: Sólidos solubles totales

Sobre la base de las consideraciones anteriores (análisis screening), se ajustó el conjunto de modelos (metamodelo) que emulan el proceso de producción del *Lactobacillus casei* empleando como sustrato *Garcinia madruno* enriquecido con lactosa. Tomando cada modelo de los resultados anteriores, en las figuras 18, 19 y 20, se muestran los modelos y la significancia estadística para cada término del modelo, que se utilizó en 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 concentración de biomasa, los Sólidos solubles totales (°Brix) Target (indica “valor especificado es mejor”) y Minimizar la concentración de etanol.

Parameter Estimates				
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	-1,905e+8	39079128	-4,87	0,0001*
X7 Tiempo de ferm	25008555	773879,1	32,32	<,0001*
X4 %lactosa	5721551,5	238434,4	24,00	<,0001*
X6 Aereacion	-87449943	3756480	-23,28	<,0001*
X2 °T	7143535,8	550985,7	12,97	<,0001*
X3 %sustrato	-3166288	269238,3	-11,76	<,0001*
X5 agitacion	-347934,9	46305,47	-7,51	<,0001*
X1 pH	28809431	3595452	8,01	<,0001*
(X7 Tiempo de ferm-10,9881)*(X7 Tiempo de ferm-10,9881)	-167930	523830,4	-0,32	0,7524
(X4 %lactosa-19,1415)*(X6 Aereacion-1,74047)	-3103327	1326042	-2,34	0,0317*
(X6 Aereacion-1,74047)*(X6 Aereacion-1,74047)	74508772	12246357	6,08	<,0001*

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

Parameter Estimates				
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	-0,686539	0,303725	-2,26	0,0357*
X7 Tiempo de ferm	-0,102782	0,00699	-14,70	<,0001*
X3 %sustrato	-0,037356	0,002101	-17,78	<,0001*
X5 agitacion	0,0074087	0,000414	17,90	<,0001*
X1 pH	0,5093005	0,027184	18,73	<,0001*
X2 °T	0,0626544	0,003435	18,24	<,0001*
X6 Aereacion	0,2683232	0,02772	9,68	<,0001*
X4 %lactosa	-0,015197	0,001744	-8,71	<,0001*
(X5 agitacion-242,139)*(X5 agitacion-242,139)	0,0000653	1,713e-5	3,81	0,0012*

Figura 19. Modelo para la respuesta Y₂: Concentración de etanol

Parameter Estimates				
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	-1,905e+8	39079128	-4,87	0,0001*
X7 Tiempo de ferm	25008555	773879,1	32,32	<,0001*
X4 %lactosa	5721551,5	238434,4	24,00	<,0001*
X6 Aereacion	-87449943	3756480	-23,28	<,0001*
X2 °T	7143535,8	550985,7	12,97	<,0001*
X3 %sustrato	-3166288	269238,3	-11,76	<,0001*
X5 agitacion	-347934,9	46305,47	-7,51	<,0001*
X1 pH	28809431	3595452	8,01	<,0001*
(X7 Tiempo de ferm-10,9881)*(X7 Tiempo de ferm-10,9881)	-167930	523830,4	-0,32	0,7524
(X4 %lactosa-19,1415)*(X6 Aereacion-1,74047)	-3103327	1326042	-2,34	0,0317*
(X6 Aereacion-1,74047)*(X6 Aereacion-1,74047)	74508772	12246357	6,08	<,0001*

Figura 20. Modelo para la respuesta Y₃: Sólidos solubles totales

Las figuras 21, 22 y 23 muestran que los valores medidos son muy similares a los predichos por los modelos ajustados con mínimos cuadrados ordinarios matricial, con la metodología Screening SAS JMP (Sustitución forward), más el alto valor del coeficiente de regresión (RSq) que se ubica por el orden del 99 por ciento, indican que los modelos son de excelente bondad de ajuste; esto, estima que es válido su empleo para optimizar operativamente el proceso de producción del *Lactobacillus casei* empleando como sustrato *Garcinia madruno* enriquecido con lactosa.

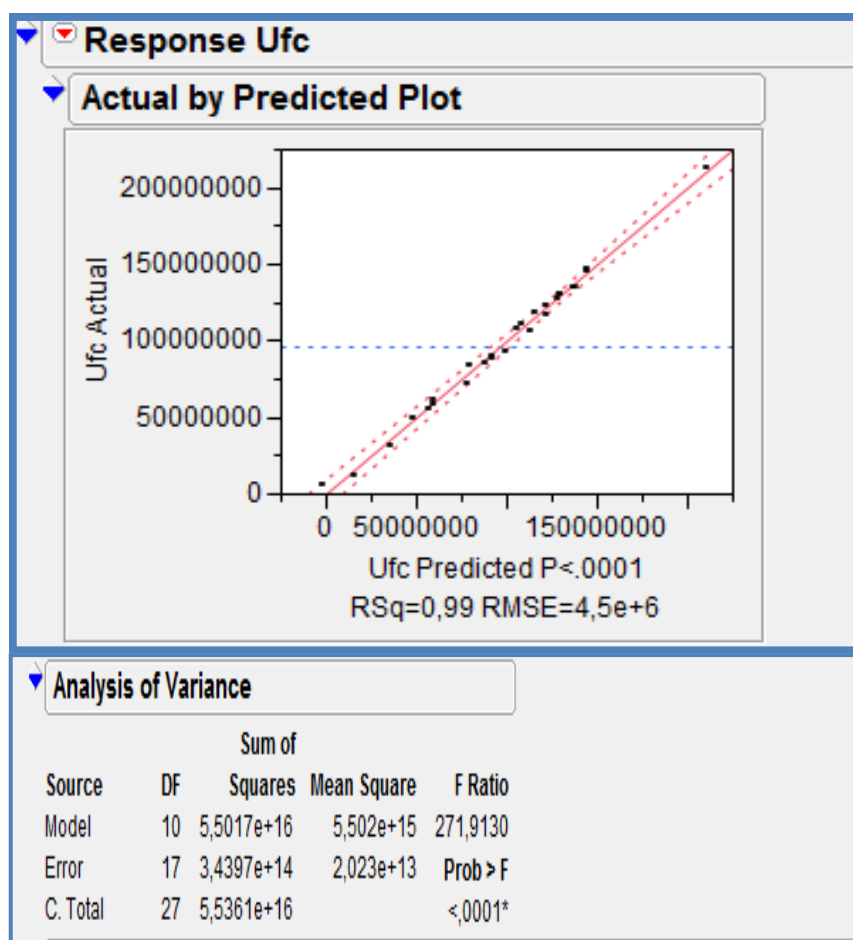


Figura 21. Valores medidos vs valores predichos, para la visualización de la bondad de ajuste del modelo para biomasa bajo diseño Hípercubo Latino.

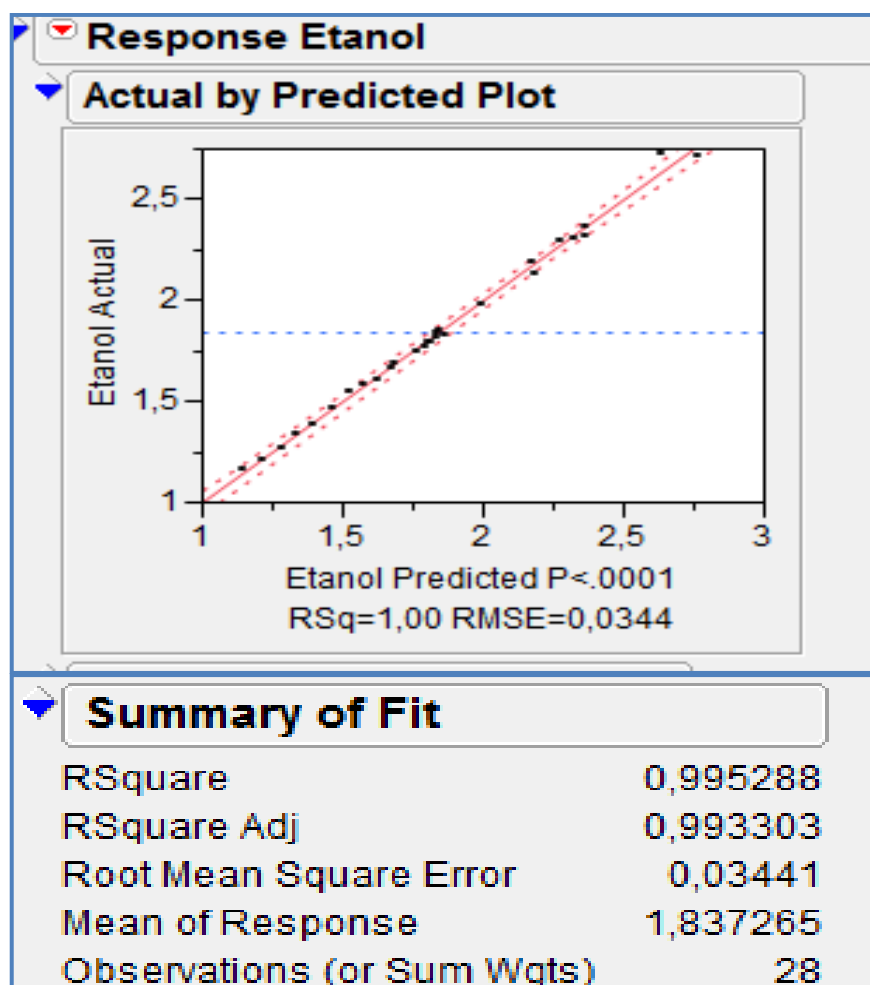


Figura 22. Valores medidos vs valores predichos, para la visualización de la bondad de ajuste del modelo para etanol bajo diseño Hípercubo Latino.

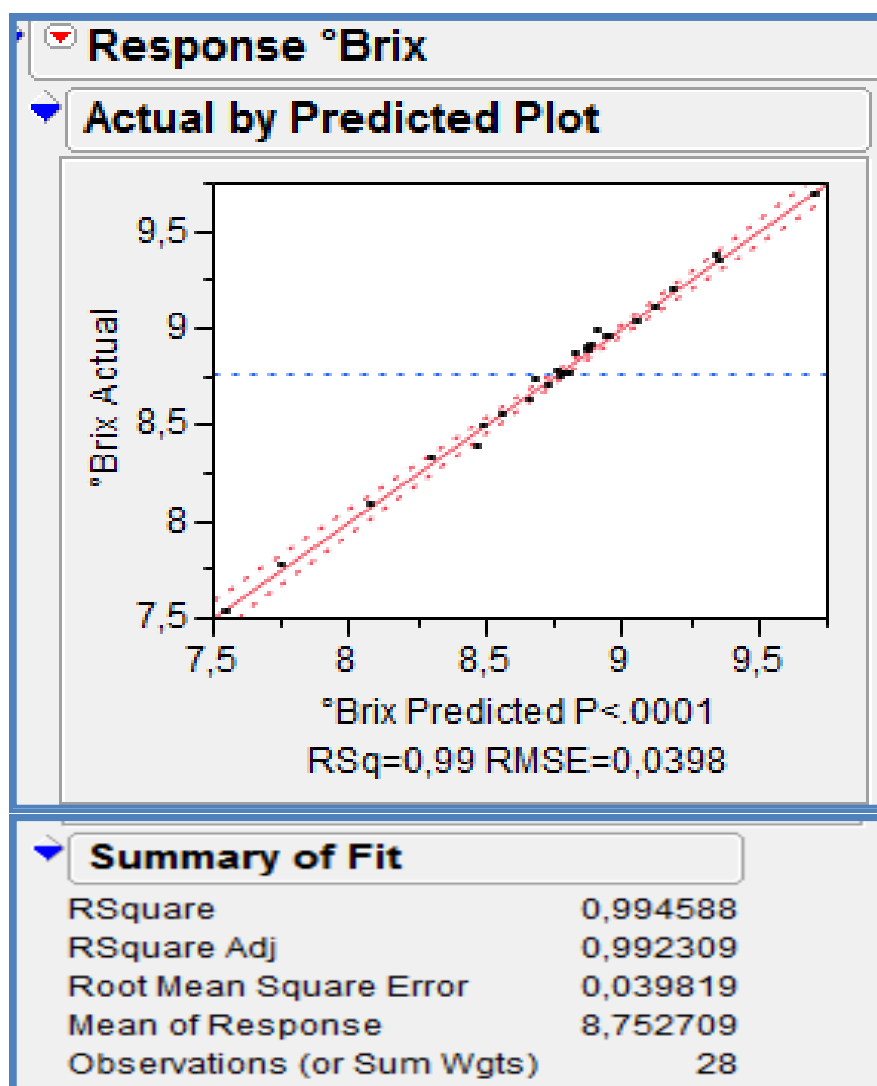


Figura 23. Valores medidos vs valores predichos, para la visualización de la bondad de ajuste del modelo para sólidos totales bajo diseño Hípercubo Latino.

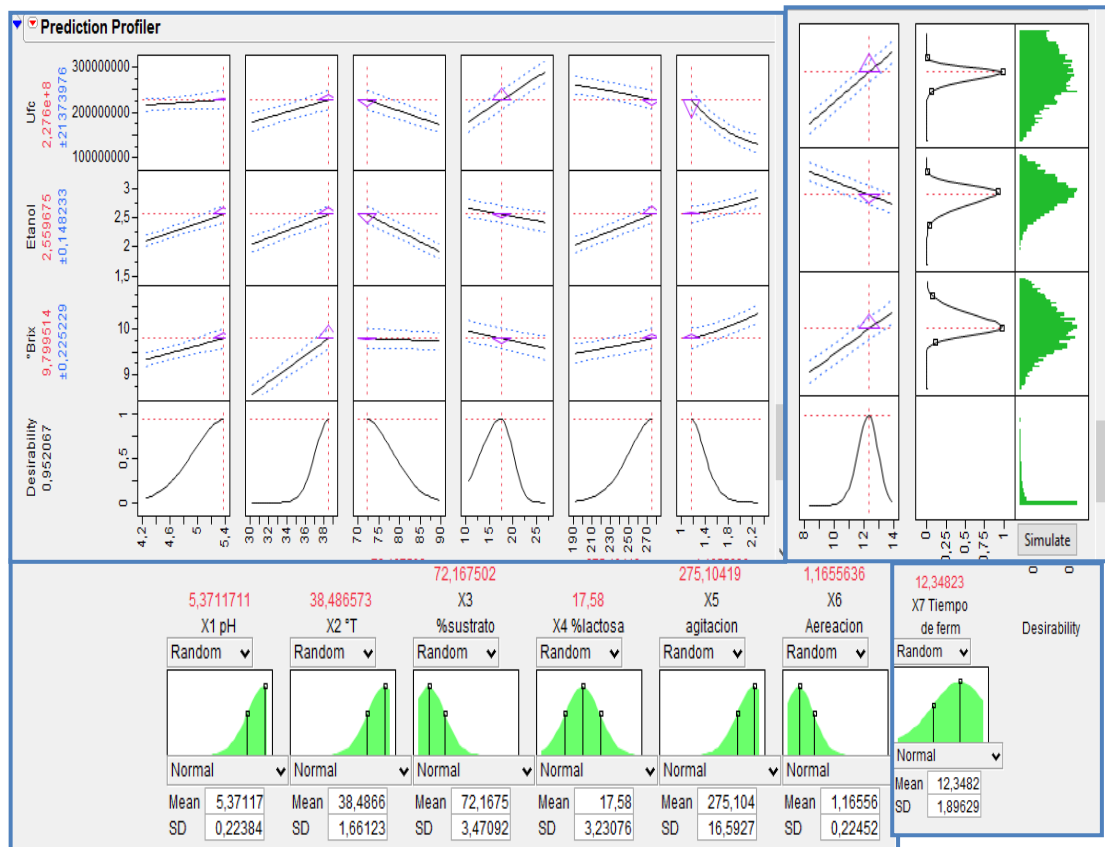


Figura 24. Optimización operativa bajo el diseño Hípercubo Latino.

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. 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 72,17 por ciento de *Garcinia madruno* enriquecido con lactosa al 17,58 por ciento, manteniendo la temperatura en el biorreactor en 38,49 °C y garantizando una velocidad de

agitación 275,104 rpm, una aireación de 1,17 cfm, un pH de 5,37 y con un tiempo de fermentación de 12,35 horas es posible obtener una cantidad de biomasa de $2,28 \times 10^8$ Ufc/ml; con la ubicación de los sólidos solubles totales en 9,80 ° Brix; y un contenido de etanol de 2,56 g/l.

Determinación de la eficiencia productiva empleando el método no paramétrico DEA (Data envelopment analysis).

Para determinar la eficiencia productiva del proceso se consideraron los criterios propuestos por Farrell (1957), que centran su atención en la utilización más adecuada de los recursos (mayor producción de biomasa de *Lactobacillus casei*) con el fin de obtener la mayor producción (biomasa de *Lactobacillus casei*) del conjunto de muestras objeto de estudio (tratamientos), para ello se empleó el software Análisis Frontier Banxia a fin de cuantificar las eficiencias relativas de los 28 tratamientos y comparar las que presentaron mejor comportamiento, de forma de obtener el tratamiento que está aprovechando de manera adecuada los recursos (insumos) y que permite incrementar la producción del microorganismo.

En ese sentido la figura 25, muestra el diagrama de proceso del sistema simulado utilizando DEA CCR, el cual trata de minimizar las entradas para producir las mismas salidas. Con este propósito, las entradas y salida fueron seleccionadas tomando en consideración los criterios descritos por Rescala *et al.*, (2012), que se enfocan en incrementar la capacidad del DEA para discriminar y por ende ponderar las unidades, cuando las mismas (tratamientos) son superiores al doble del producto del número de entradas por el número de salidas y su grado de correlación es bajo, a fin de evitar que existan factores comunes que no permitan explicar el total de la información. En consecuencia, se seleccionaron como entradas las variables concentración de sustrato, concentración de lactosa y tiempo máximo de fermentación debido a que son las que mejor simulan el proceso y como salida la concentración de biomasa *Lactobacillus casei* (Ufc/ml).

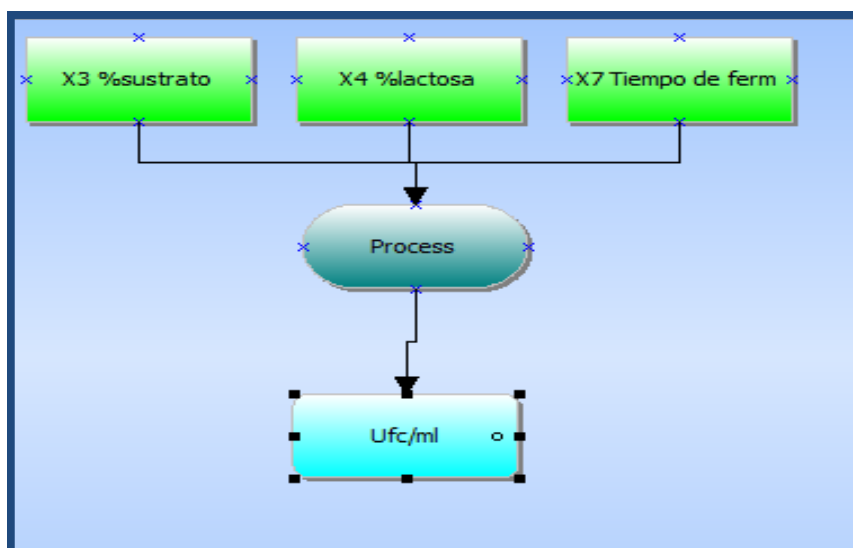


Figura 25. Diagrama de Procesos del Sistema Simulado.

En las Figuras 26, 27 y 28 se observan los valores de eficiencia relativa para los tratamientos agrupados en tres corridas experimentales, con conjuntos cuyo número de DMU no supera los 12 tratamientos, debido a que el Análisis Frontier Banxia es un software de prueba y no permite un número mayor de unidades, en tal sentido los tratamientos que experimentan la mejor eficiencia relativa son el 4, 14, 20, 25 y 26. Hecha la observación anterior, es posible afirmar que la herramienta DEA es una alternativa que permite tomar decisiones acertadas al momento de optimizar la utilización de los recursos contribuyendo en un área tan compleja como es la producción de microorganismos.

Units		Comparison 1	
Unit name	Score	Efficient	
tratamiento 1	9,3%		
tratamiento 10	38,6%		
tratamiento 11	56,2%		
tratamiento 12	64,9%		
tratamiento 2	75,1%		
tratamiento 3	42,8%		
tratamiento 4	100,0%	✓	
tratamiento 5	22,9%		
tratamiento 6	58,8%		
tratamiento 7	91,8%		
tratamiento 8	89,8%		
tratamiento 9	91,4%		

Figura 26. Comparación de la Eficiencia para los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Units		Comparison 1	
Unit name	Score	Efficient	
tratamiento 13	82,1%		
tratamiento 14	100,0%	✓	
tratamiento 15	65,5%		
tratamiento 16	75,2%		
tratamiento 17	51,4%		
tratamiento 18	84,5%		
tratamiento 19	75,0%		
tratamiento 20	100,0%	✓	
tratamiento 21	60,2%		
tratamiento 22	5,3%		
tratamiento 23	100,0%	✓	
tratamiento 24	56,9%		

Figura 27. Comparación de la Eficiencia para los tratamientos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

Units	Comparison 1	
Unit name	Score	Efficient
tratamiento 25	100,0%	✓
tratamiento 26	100,0%	✓
tratamiento 27	61,9%	

Figura 28. Comparación de la Eficiencia para los tratamientos 25, 26, 27 y 28.

En la figura 29 se observa que la máxima eficiencia del sistema simulado se ubica en el tratamiento 4, debido a que logró alcanzar una eficiencia productiva del 100 por ciento, lo que indica que es capaz de incrementar la producción de biomasa de *Lactobacillus casei* por medio de la elección de la alternativa que puede suministrar el mayor beneficio (menor cantidad de sustrato, lactosa y tiempo de fermentación) cumpliendo con los principios de calidad y productividad como lo plantean Lam y Hernández (2008).

Units	Comparison 1	
Unit name	Score	Efficient
tratamiento 12	64,9%	
tratamiento 13	69,6%	
tratamiento 14	97,5%	
tratamiento 18	66,4%	
tratamiento 2	75,1%	
tratamiento 20	86,8%	
tratamiento 23	87,3%	
tratamiento 26	73,5%	
tratamiento 4	100,0%	✓
tratamiento 7	91,8%	
tratamiento 8	89,8%	
tratamiento 9	91,4%	

Figura 29. Comparación de la Eficiencia para los tratamientos 2, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 18, 20, 23 y 26.

En la figura 30 que se muestra a continuación se observa que para obtener $2,14 \times 10^8$ Ufc/ml de biomasa de *Lactobacillus casei* es necesario incorporar al

cultivo 83 por ciento de pulpa de *Garcinia madruno*, a fin de obtener una eficiencia de 100 %, además se evidencia que las variables de entrada y salida son capaces de explicar el total de la información, debido a que el grado de correlación lineal entre las mismas es muy bajo de 0,01 lo que permite que el DEA aumente su capacidad de ponderación como lo sugiere Rescala *et al.*, (2012) en su investigación.

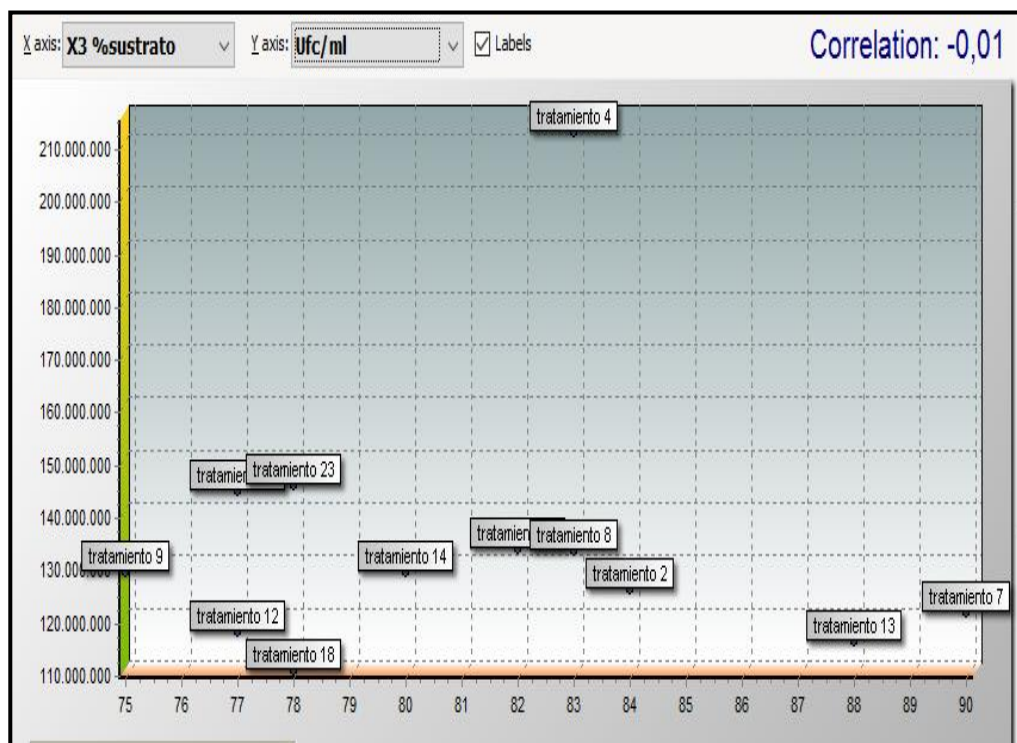


Figura 30. Rendimiento de biomasa (ufc/ml) en función del sustrato (%).

CONCLUSIONES

Luego de los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente tesis doctoral, en este apartado se exponen en primer lugar las conclusiones que dan respuesta a los objetivos planteados en el capítulo I y posteriormente aquellas que el autor ha considerado pertinentes por tratarse de hallazgos que contribuyen al conocimiento.

Respecto al primer objetivo planteado, el *Garcinia madruno* demostró ser un fruto silvestre con fuentes naturales de nutrientes, cuya pulpa tiene una buena densidad de 1,04 g/ml comparada con las de su especie, aun cuando reportó una baja cantidad de azúcares totales (8 °Brix) y una alta presencia de humedad, puede ser considerado un sustrato apropiado para el desarrollo del microorganismo, debido a que éste necesita no solo azúcares sino también minerales, vitaminas y gran cantidad de agua libre para desarrollar en mejor condición sus actividades metabólicas.

En cuanto al segundo objetivo, el arreglo de tratamientos Hipercubo Latino utilizado, demostró ser una muy buena estrategia de diseño, debido a que permitió identificar los cambios significativos en las respectivas respuestas tecnológicas medidas, que influyen en el metabolismo del *Lactobacillus casei*. En este propósito, el tratamiento 4, fue el único capaz de generar un elevado crecimiento microbiano de $2,14 \times 10^8$ Ufc/ml, lo que indica que las condiciones del cultivo y la composición nutricional que presenta el *Garcinia madruno*, potencian el desarrollo eficiente del microorganismo. Con referencia a lo anterior, esta ventaja se debe en gran parte a su riqueza en minerales, azúcares (fructosa) y proteínas que posee el sustrato y que favorecen la formación de la pared celular del *Lactobacillus casei*, permitiéndole de esta forma ser tan efectivo como un medio convencional.

Con referencia al tercer objetivo, a través de la investigación fue posible ajustar modelos lineales aditivos de alto orden, con excelente bondad de ajuste,

para el proceso de producción de *Lactobacillus casei* empleando un sustrato no convencional, poco explotado a nivel industrial. En ese mismo sentido, los modelos ajustados y la metodología de optimización vía simulación, permitieron localizar (pronosticar) condiciones operativas óptimas para el proceso de producción del microorganismo, indicando que con una mezcla de 72,17 por ciento de *Garcinia madruno* enriquecido con lactosa al 17,58 por ciento, manteniendo la temperatura en el biorreactor en 38,49 °C y garantizando una velocidad de agitación 275,104 rpm, una aireación de 1,17 cfm, un pH de 5,37 y con un tiempo de fermentación de 12,35 horas es posible obtener una concentración de biomasa de $2,28 \times 10^8$ Ufc/ml; 9,80 °Brix de sólidos solubles totales y una concentración de etanol de 2,56 g/l.

Con respecto al cuarto objetivo, el *Lactobacillus casei* es un microorganismo capaz de desarrollarse y multiplicarse en un medio que reúna las condiciones adecuadas y las frutas como el *Garcinia madruno* constituyen un medio idóneo porque le provee los nutrientes y la humedad que necesitan para crecer, lo cual se ve reflejado en el estudio de eficiencia realizado a través software análisis Frontier Baxia, donde mostró una eficiencia productiva del 100 por ciento (eficiencia relativa con respecto a los tratamientos comparados). En ese sentido el sustrato ha demostrado ser una buena alternativa para la producción de un microorganismo probiótico tan importante para el ser humano debido a que permite el fortalecimiento contra enfermedades gastrointestinales manteniendo un equilibrio de la flora bacteriana en el intestino delgado y a su vez, del sistema inmunológico del ser humano, previniendo las evacuaciones líquidas e impactando positivamente en la salud del ser humano.

Otras conclusiones relevantes del estudio son los beneficios que ofrece a la calidad de vida del ser humano, al presentar una alternativa para la producción de *Lactobacillus casei* a partir de un sustrato no comercial, que permita reducir los costos con la finalidad de que pueda llegar a todas las familias, en especial las más desprotegidas económicamente y así combatir las enfermedades como la evacuación líquida y la intolerancia a la lactosa, garantizando de esta manera la

efectividad de la investigación que busca que los objetivos planteados sean trascendentes en cuanto a su aporte a la salud, a la sociedad y al conocimiento universal.

RECOMENDACIONES

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

- 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 *Lactobacillus casei*.
- Comprobar de manera experimental que los resultados de la optimización operativa bajo el diseño Hípercubo Latino reproducen las respuestas de la simulación.
- Actualizar los equipos del laboratorio (biorreactor) para minimizar los costos operativos en cada corrida.
- Utilizar liofilizador al finalizar cada corrida experimental, para mantener y alargar la vida útil de la muestra.
- Emplear un control más expedito de POR (potencial oxido reducción), con el fin de mantener más ajustados los metabolitos secundarios durante el proceso.

- ANDER-EGG, E. (2002). Metodología y práctica del desarrollo de la comunidad. Argentina. Editorial Lumen.
- ADRIAN, J.; POTUS, J.; POIFFAIT, A.; DAUVILLIER, P. (2000). Análisis Nutricional de los Alimentos, 1^{era} edición español, Editorial Acribia, España.
- ANGULO, J.; GARCÍA, A.; PEDROZA, A.; MARTÍNEZ, M.; GUTIÉRREZ, V. (2012). Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. *Universitas Scientiarum*, Vol. 17, N°. 1. Pp: 43-52.
- AMORES, R.; CALVO, A.; MAESTRE, J.; MARTINEZ, D. (2004). Probióticos. Revisión. *Rev. Esp. Quimioterap*, Vol. 17, N°. 2. Pp: 131-139.
- AREVALO, E.; CAYOTOPA, J.; OLIVERA, D.; GÁRATE, M.; TRIGOSO, E.; COSTA, D.; LEÓN, B. (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. *Rev. investig. Altoandin.*, Vol. 19, N°. 2. Pp: 135-144. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2313-29572017000200003&lng=es&nrm=iso. ISSN 2313-2957. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2017.272>.
- ARIAS, F. (2012). El Proyecto de Investigación. Introducción a la Metodología Científica. Sexta Edición. Caracas, Venezuela. Editorial Episteme. Pp: 67-71.
- ARNAN, X.; QUEVEDO, L.; RODRIGO, A. (2013). Forest fire occurrence increases the distribution of a scarce forest type in the Mediterranean basin. *Acta Oecol*, Vol. 46. Pp: 39-47.
- ARIANOUTSOU, M.; DIAMANTOPOULOS, J. (1985). Comparative phenology of five dominant plant species in maquis and phrygana ecosystems in Greece. *Phyton (Austria)*, Vol. 25. Pp: 77-85.
- 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.
- AVILA, E.; RIVAS, A. (2018). Creación de un acidulante comercial para ensilado químico de pastos, forrajes y residuos de beneficio animal, de alta humedad. Trabajo de Ascenso. San Carlos, Venezuela. 96 p.
- ÁVILA, H. (2006) Introducción a la metodología de la investigación. Sexta Edición. CD. Cuauhtemoc, Chihuahua, México. Editorial Eume.Net. Edición Electrónica. Pp: 174 p.
- BALAM, P.; OCHOA, E.; SONDA, O. (2002). Perfil de Mortalidad en el Estado de Yucatán, México. *Rev Bioméd*, Vol. 13, N°. 1, Enero- Marzo. Pp: 1-8.

- BALESTRINI, M.** (2006). Como se elabora el proyecto de investigación. Quinta Edición. Caracas, Venezuela. Editorial B.L Consultores y Asociados. 265p.
- BARRERO, L.** (2016). Microbiología clínica. Madrid, España. Editorial Síntesis. Pp: 37-52.
- BERGEY, D.; HOLT, J.** (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth edition. Editorial Baltimore: Williams & Wilkins. 787 p.
- BISQUERRA, R.** (2000). Métodos de investigación educativa. Barcelona, España. Grupo editorial Ceac. 382 p.
- BONILLA, M.; CASASÚS, T.; MEDAL, A.; SALA, R.** (1996). Un análisis de la eficiencia de los puertos españoles, Universidad de Valencia.
- BRINK, M.; TODOROV, S.** (2006). The effect of probiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 100, Nº. 4. Pp: 813-820.
- BRITANIA.** (s/f). M.R.S. AGAR. [Artículo en línea]. [Consulta el 17/08/2019]. Disponible en https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2842df7536d.pdf
- CÁNOVAS, F.** (1993). Principios básicos de la hidroponía. Aspectos comunes y diferenciales de los cultivos con y sin suelo. En: Cultivos sin suelo. Curso Superior de Especialización. F. Cánovas y J. R. Díaz. Editorial del Instituto de Estudios Almerienses y F.I.A.P.A.
- CARRILLO, L.; RAMIREZ, A.; OSORIO, E.** (2019). Chemometric classification of *Garcinia madruno* raw material: impact of the regional origin and ripeness stage of a neotropical exotic species. *Food Chemistry-Elsevier*, Vol. 293, Nº. 1, Septiembre. Pp: 291-298.
- CASADO, M.; TORRICO, G.; MENDOZA, M.** (2012). Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. [Artículo en línea]. [Consulta el 18/07/2019]. Disponible en <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- CASTILLO, H.** (2008). Aprendizaje de conceptos químicos desde el análisis fitoquímico del madroño aplicando enseñanza para la comprensión, *Memorias del IIEC*, Vol. 2, Nº. 3. Pp: 35-40.
- CENTTY, D.** (s/f). Unidades de análisis. [Artículo en línea]. [Consulta el 18/08/2019]. Disponible en <http://www.eumed.net/librosgratis/2010e/816/UNIDADES%20DE%20ANALISIS.htm>

CHAVEZ, G.; ABELA, M.; BRAVO, J.; PEÑARRIETA, J.; RENDON, W. (2012). Estudio del fruto comestible de la especie vegetal *Garcinia madruno*. *Revista Científica Electrónica Boliviana de Química*, Vol. 29, N°. 1. Pp: 87-93.

CIBIOGEM. (2008). Biotecnología y bioseguridad en México. [Artículo en línea]. [Consulta el 02/03/2018]. Disponible en https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/divulgacion/Que_es_la_Biotecnologia.pdf

CBUC.(2013) Centro de biotecnología Universidad de Concepción. ¿Qué es la biotecnología? [Artículo en línea], [consulta el 02/03/2018]. Disponible en <http://www.centrobiotecnologia.cl/index.php/que-es-la-biotecnologia>

CONVITE. (2018). Monitoreo del derecho a la salud en Venezuela. Boletín N°. 10, Mayo. Pp: 1-12.

CORRALES, L.; ANTOLINEZ, D.; BOHÒRQUEZ, J.; CORREDOR, A. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Revista Científica Electrónica Nova*, Vol. 13, N°. 23. Pp: 55-81.

COVENIN 1104:1996. (1996). Norma Venezolana 1104. Determinación de número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *Echerichia coli*. 2^{da} Revisión. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. p. 1 – 15.

COVENIN 1195:80. (1980). Norma Venezolana 1195. Alimentos. Determinación de Nitrógeno. Método Kjeldahl. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. p. 1 – 3.

COVENIN 1337:90. (1990). Norma Venezolana 1337. Alimentos. Métodos para recuento de mohos y levaduras. 1^{era} Revisión. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. p. 1 – 10.

CRAVO, G. (2012). Estrategias para el diseño de un control adaptativo en producción de bacterias ácido lácticas. *Revista Agrollania*, Vol. 9. Enero-Diciembre. Pág. 62.

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.

CRAVO, G. (2013). Plan de calidad para la producción de biomasa de *Lactobacillus casei* usando como sustrato *Garcinia madruno*. Memorias de las XX Jornadas Técnicas de Creación Intelectual y IV de Postgrado. San Carlos, Venezuela. Octubre. Pp: 138-144.

CRAVO, G.; CRESPO, LL.; AFFAQUI, E.; ANGULO, E. (2015). Diseño de un sistema de control para la producción de goma de xantana, utilizando como

sustrato níspero (*manilkara zapot*). Memorias de las XXI Jornadas Técnicas de Creación Intelectual y V de Postgrado. San Carlos, Venezuela. Octubre, 2015. Pp: 139-147.

CUAURO, R. (2014). Proyecto. Guía didáctica Metodológica para el Estudiante. Modulo Núm. 2.

DELGADO, J. (1991). Algunas consideraciones en torno al debate entre los enfoques cuantitativo y cualitativo de investigación en las ciencias sociales. Paradigma. Vol. XIII. Nº. 1 y 2. Caracas, Venezuela: UPEL.

DÍAZ, C.; BATANERO, C. Y COBO, B. (2003). Fiabilidad y generalizabilidad. Aplicaciones en evaluación educativa. Revista Números. Edición 54. Pp. 3-21.

DOMÍNGUEZ, R.; WANG, R.; CARRILLO, J. (2002). Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. Tecnología Ciencia Ed (IMIQ), Vol. 17, Nº. 2. Pp: 77-83.

DOS SANTOS, A. (2007). Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Tesis Doctoral. Barcelona, España. 282 p.

DUBEY, A.; RAJESHWARI, K.; CHAKRAVARTY, A.; FAMULARO, G. (2008). Use of in the treatment of rotavirus diarrhea in children: preliminary results, *J Clin Gastroenterol*, Vol. 42, (Suppl. 3 Pt 1). Pp: 126-129.

DYSON, R. G.; ALLEN, R.; CAMANHO, A.; PODINOVSKI, V.; SARRICO, C.; SHALE, E. (2001). Pitfalls and protocols in DEA. *European Journal of Operational Research*, Vol. 132, Nº. 2. Pp: 245-259.

ESCALADA, M. (2010). Conceptos y técnicas de biotecnología I. biorreactores. [Artículo en línea], [consulta el 02/03/2018]. Disponible en www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/.../Reactores%20biologicos%2092010%20Marina.ppt

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

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ADMINISTRATION. (2002). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. [Artículo en línea]. [Consulta el 02/06/2019]. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>

FARRELL, M. (1957). The measurement of productive efficiency. *Journal of the Royal Statistical Society, Series A* Vol.120, Nº. 3. Pp: 253-281

- FITZGERALD, R.; MURRAY, B.** (2006). Bioactive peptides concentration of *Aloe vera* plants exposed to three and lactic fermentations. *International Journal of Environmental and Experimental Dairy Technology*, Vol. 59, N°. 1. Pp: 118-125.
- FORSBERG, B.; PETZOLD, M.; TOMSON, G.; ALLEBECK, P.** (2007). Diarrhea case management in low- and middle- income countries- an unfinished agenda. *Bull world Health Organ*, Vol. 85, N°. 1, Enero. Pp: 42-48.
- GALVEZ, A.; ABRIGUEL, H.; LÓPEZ, R.; BEN, O.** (2007). *Int J Food Microbiol*, Nov 30, Vol. 120, N° (1-2). Pp: 51-70.
- GARCÌA, A.** (2009). El análisis envolvente de datos, herramienta para la medición de la eficiencia en instituciones sanitarias, potencialidades y limitaciones. *Rev Cubana Hig Epidemiol*, Vol. 47, N°. 2. Pp: 1-10.
- GARCIA, C.** (2018). Aislamiento, cultivo, fermentación y cinética del crecimiento de *Lactobacillus casei shirota* [Artículo en línea]. [consulta el 03/07/2019]. Disponible en <https://www.studocu.com/en/document/universidad-autonoma-de-sinaloa/bioingenieria/other/aislamiento-cultivo-fermentacion-y-cinetica-del-crecimiento-de-lactobacillus-casei-shirota/2325021/view>
- GOMES, A.; MALCATA, X.** (1999). *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Foods & Technology*, Vol. 10, N°. 4-5. Pp: 139-157.
- GONZALEZ, B.; DOMINGUEZ, R.; ALCOCER, B.** (2008). Aloe vera como sustrato para el crecimiento de *lactobacillus plantarum* y *l. casei*. *Cienc. Tecnol. Aliment*, Vol. 6, N°. 2. Pp: 152-157.
- GONZALEZ, R.; MONTES DE OCA, N.; RIVERON, Y.; NUÑEZ, A.** (2002). Aseguramiento de la calidad en las Colecciones de Cultivos Microbianos. *Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria CENSA, la Habana Cuba*. Pp: 1-30.
- GRATANI, L.; GHIA, E.** (2002). Changes in morphological and physiological traits during leaf expansion of *Arbutus unedo*. *Environ. Exp. Bot*, Vol. 48. Pp: 51–60.
- GUFFANTE, T.; GUFFANTE, F.; CHAVEZ, P.** (2016). Investigación científica. El proyecto de investigación. Chimborazo Ecuador. 108 p.
- HEMPEL, S.; NEWBERRY, S.; MAHER, A.; WANG, Z.; MILES, J.; SHANMAN, R.** (2012). Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, Vol. 307, N°. 18, Mayo. Pp: 1959–1969.

- HEMSON, M.** (2006). Biochemical Reactor Modeling and Control: Exploiting Cellular Biology to Manufacture High Value Products". *Revista Científica Electrónica IEEE Control Systems Magazine*, Vol. 26, [consulta el 02/09/2016]. Pp. 54-62. Disponible en <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=17953488>
- HERNÁNDEZ, R., FERNÁNDEZ, C., BAPTISTA, P.** (2014). Metodología de la Investigación. Sexta Edición. D.F, México. Editorial McGraw-Hill. Pp: 196-214.
- HERRERA, C.** (1998). Long-term dynamics of Mediterranean frugivorous birds and fleshy fruits: a 12-year study. *Ecol. Monogr*, Vol. 68, N°. 4, 1998. Pp: 511–538.
- HERRERA, J.** (2004). Biología de la reproducción de las plantas en el Monte Mediterráneo. En: Herrera, C.M.; (eds.): El monte mediterráneo en Andalucía, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla. Pp: 21–27.
- HOLZAPFEL, W.** (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International journal of food microbiology*, Vol. 75, N°. 3, Mayo. Pp: 197-212.
- HURTADO, J.** (2012). Metodología de la Investigación. Guía para la comprensión holística de la ciencia. 4a Edición. Caracas, Venezuela. Ediciones Quirón. 1327 p.
- ISOLAURI, E.** (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*, Vol. 88, N°. 1. Pp: 90-97.
- JAIME, J.** (2016). Formulación en el Análisis Envolvente de Datos (DEA). Resolución de casos prácticos. Tesis de Maestría. Sevilla, España, 2016. 93 p.
- JAMES, M.; VELASTEGUI, E.; CRUZ, M.** (2017). Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio, con inulina como fuente de carbono. *Bionatura*, Vol. 2, N°. 1, Pp: 235- 240. Disponible en <http://www.revistabionatura.com>
- JMP.** (2013). SAS Institute Inc. Using JMP 11. Cary, NC: SAS Institute Inc. Inc. http://www.jmp.com/support/downloads/pdf/jmp11/Using_JMP.pdf
- JUNCO, R.; RODRIGUEZ, C.** (2001). Cultivo y crecimiento de microorganismos. [Artículo en línea]. [consulta el 07/01/2019]. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/288670374_Cultivo_y_crecimiento_de_los_microorganismos
- JURADO, H.** (2009). Evaluación de bacterias ácido-lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de precebo como alternativa al uso de antibióticos. Tesis Doctoral en Ingeniería de Alimentos. Valle del Cauca, Colombia: Universidad del Valle. 170 p.

- JURADO, H.; CALPA, F.; CHASPUENGAL, A.** (2014). Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Veterinaria y Zootecnia*, Vol. 8, N°. 2. Pp: 15-35.
- KANDLER, O.; WEISS, N.** (1986). Genus *Lactobacillus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 2. Williams and Wilkins Publications. Baltimore. Pp. 1209-1234.
- KIRK, R.; SAWYER, R.; EGAN, H.** (1996). Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. 2º ed. en español, Compañía Editorial Continental, S.A., México.
- KOSHKIN N.; SHIRKÉVICH M.** (1975). Manual de Física Elemental. Editorial Mir. Pp: 36, 74-75, 85-86.
- 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
- LEON, M.** (2012). Evaluación in vitro de Cepas de Bacterias Ácido Lácticas Nativas con Potencial Probiótico. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Montevideo, Uruguay. 54 p.
- LEÒN, D.; CALDERÓN, B; MARTÍNEZ, A.; SÁNCHEZ, E.; ZULATTO, A.; CAMACHO, I.; ARREDONDO, A.; SALGADO, R.** (2013). Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, Vol. 12, N°. 12, enero - diciembre. Pp: 133-144.
- LIM, T.** (2012). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. *Springer*, Vol. 4. Pp: 64-90.
- LÓPEZ, G.** (2001). Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. Tomo II. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid – Barcelona – México.
- LÓPEZ, L.; TORRES, C.** (2006). Medios de cultivo. [Artículo en línea]. [consulta el 10/01/2019]. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>
- LOZANO, M.** (2011). Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus casei shirota* en una gelatina de pitaya (*Stenocereus griseus H.*). Tesis de Maestría. D.F, México, 88 p.

- MACFARLANE, GT.; COMMINGS, JH.** (1999). Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *British Medical Journal*, Vol. 318, N°. 7189. Pp: 999-1003.
- MADIGAN, MT; MATINKO, JM; PARKER, J; BROCK.** (2004). *Biología de los microorganismos*, 10^a Edición. Barcelona, España. Editorial Prentice Hall.
- MANZANO, C.; ESPUTIÑAN, D.; POVEDA, E.** (2012). Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia, *Rev Chil Nutr*, Vol. 39, N°. 1, Marzo. Pp: 98–110.
- MARIN, N.; SAAVEDRA, J.; ZUÑIGA, L.; SALGUERO, C.** (2016). Los probióticos: microorganismos vivos que previenen enfermedades en adultos y niños. *Medicina*, Vol. 38, N°. 3. Pp: 247-263. Disponible en <https://revistamedicina.net/ojsanm/index.php/medicina/article/view/114-5>
- MATSUZAKI, T.** (1998). Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 41. Pp: 133-140.
- MATH WORKS.** (2014). Optimization Toolbox. R2014b for Use with MATLAB®, MATLAB, USA. <http://www.mathworks.com/>
- MEDELLIN, D.** (2015). Sistemática del género *Garcinia* (*Clusiaceae*): revisión taxonómica para Colombia y filogenia de las especies Neotropicales. Tesis de Maestría en Ciencias. Bogotá, Colombia. 131 p.
- MOKATE, K.** (1999). Eficacia, eficiencia, equidad y sostenibilidad: ¿Qué queremos decir?. [Artículo en línea]. [consulta el 07/01/2019]. Disponible en https://www.cepal.org/ilpes/noticias/paginas/9/37779/gover_2006_03_eficacia_eficiencia.pdf
- MONTALTO, M.; CURIGLIANO, V.; SANTORO, L.** (2006). Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol*, Vol. 12, N°. 2. Pp: 187–191.
- MORALES, L.; VARÓN, T.** (2006). Árboles Ornamentales en el Valle de Aburrá, Elementos de Manejo.
- MUSTAFA, S.; CHUA, L.; EL-ENSHASY, H.** (2019). Effects of Agitation Speed and Kinetic Studies on Probiotication of Pomegranate Juice with *Lactobacillus casei*. *Molecules*, Vol. 24, N°. 2357. Pp: 1–13.
- ÖZCAN, M.; HACISEFEROGULLARI, H.** (2007). The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering*, Vol. 78, N°. 3. Pp: 1022-1028.
- PANESSO, G.; PARDO, M.; SEPÚLVEDA, M.** (2015). Producción de Ácido Láctico a partir de Suero de Leche. [Artículo en línea]. [Consulta el 18/03/2018].

Disponible en
https://www.researchgate.net/publication/278414362_Produccion_de_Acido_lactico_lactobacillus_casei

PANTOJA, M.; MENDOZA, S.; VALERO, N. (2018). Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Microbacterium* sp. (BSC3) para la generación de materia orgánica humificada a partir de lignito. *Rev. Colomb. Biotecnol*, Vol. 20, N°. 1, Enero – Junio. Pp: 31 - 41

PLAN DE LA PATRIA. PDLP. Segundo Plan Socialista de Desarrollo Económico y Social de la Nación 2013-2019. [Artículo en línea]. [Consulta el 26/12/2018]. Disponible en
http://www.siteal.iipe.unesco.org/sites/default/files/sit_accion_files/siteal_venezuela_0461.pdf

PHOENIX INTEGRATION. (2014). PHX model center. En:
<http://www.phoenix-int.com/>

PUERTA, H. (2011). Metodología de la Investigación. [Artículo en línea]. [Consulta el 20/08/2019]. Disponible en <http://tecnologiasenlaead.blogspot.com/>

QUEVEDO, L.; ARNAN, X.; RODRIGO, A. (2017). La gestión forestal post incendio mejora la calidad de los frutos en el monte bajo dominado por *Arbutus unedo* L. 7^{mo} Congreso Forestal Español Gestión del monte: Servicios ambientales y bioeconomía. San Carlos, Venezuela. Junio. Pp: 1-12.

RAMIREZ, J.; ULLOA, P.; VELAZQUEZ, M.; ULLOA, J.; ROMERO, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* Vol.7, N°. 7, Abril-Junio. Pp: 1-16.

RANGEL, H.; PRADILLA, M., BURGOS, C. (2001). Biorreactores: Modelos matemáticos y su simulación sobre una hoja electrónica. *Revista Ingeniería e Investigación*, N°. 48, Diciembre. Pp: 20 – 23.

REICHEMBACH, H. (1953). La filosofía científica. México, Fondo de Cultura Económica. Pp: 210-211.

RESCALA, C.; DEVINCENZI, G.; ROHDE, G.; BONAFFINI, M.; GIRAUDO, M.; BERNAOLA, G.; PAVÓN, R. (2012). Dos modelos para determinar la eficiencia de una empresa constructora, *TRIM*, Vol. 5. Pp: 21 - 38.

REZVANI, F.; ARDESTANI, L.; TORRES, O. (2017). Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 48, Issue 2, April–June. Pp: 251-258.

RINCON, I.; ARANGO, L.; TORRES, O. (2016). Metodología de análisis envolvente de datos (DEA), procesos administrativos y operacionales de las

políticas gubernamentales en los países latinoamericanos. *Revista Académica de Investigación Tlatemoani*, N°. 21. Pp: 63 – 89.

RIVERO, J.; BRUNNER, B. (2006). Árboles frutales exóticos y poco conocidos en Puerto Rico. San Juan, Puerto Rico. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. 358 p.

ROBERFROID, B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? American. *Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 71, N°. Pp: 1682-1687.

RHODES, E. (1978). Data Envelopment Analysis and Approaches for Measuring the Efficiency of Decision making Units with an Application to Program Follow-Through in U.S. Education Ph. D. dissertation, School of Urban and Public Affairs. Carnegie-Mellon University.

RUIZ, B. (2014). Frutos silvestres de uso tradicional en la alimentación: evaluación de su valor nutricional, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. Tesis Doctoral. Madrid, España. 273 p.

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

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; ISOLAURI, E. (1998). Clinical applications of probiotic bacteria. *International-Dairy-Journal* 1998, Vol. 8, N°. 5/6. Pp: 563-572.

SANCHEZ, A. (2015). Monitoreo del estado fisiológico de la levadura *xanthophyllomyces dendrorhous* durante la producción de astaxantina por medio de técnicas espectroscópicas y análisis de imágenes. Tesis de Maestría. Guadalajara, México. 122 p.

SANCHEZ, M.; RUIZ, M.; MORALES, M. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Ars. Pharm*, Vol. 56, N°. 1. Pp: 45-59.

SANDERS, M.; AKKERMANS, L.; HALLER, D.; HAMMERMAN, C.; HEIMBACH, J.; HORMANNSPERGER, G.; HUYS, G.; LUTGENDORFF, F.; MACK, D.; PHOTHIRATH, P.; AGUILAR, G.; VAUGHAN, E. (2010). Safety assessment of probiotics for human use, *Revista gut microbes*, Vol. 1, N°. 3. Pp: 164-179.

SAS JMP 8. (2012). Software SAS Institute Inc. JMP business unit SAS.JMP: John's macintosh program.

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

SEALY, J.; WEBB, D. (1950). *Arbutus unedo L. J. Ecol*, Vol. 38, N°. 1. Pp: 223–236.

- SHAH, N.** (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, Vol. 55, N°. 11. Pp: 46- 53.
- TAMAYO, M.** (2004). Proceso de la Investigación Científica. 4ta Edición. Editorial México S.A. Limusa. 175 p.
- TARANTO, M.; MÉDICI, M.; FONT DE VALDEZ, G.** (2005). Alimentos funcionales probióticos. *Revista Química Viva*, Vol. 4, N°. 1. Pp: 26-34.
- TARDÍO, J.; PASCUAL, H.; MORALES, R.** (2002). Alimentos silvestres de Madrid: Guía de plantas y setas de uso alimentario tradicional en la Comunidad de Madrid. Ediciones La Librería. Madrid.
- TODD, R.; MARTIN, J.** (1999). Selection and design of probiotics. Raleigh (USA): North Carolina State University, Department of Food Science,
- TOMASINI, A.** (2011). Los hongos filamentosos, su importancia de estudio y de aplicación industrial. [Artículo en línea]. [Consulta el 07/11/2016]. Disponible en <https://www.sistemas.fciencias.unam.mx/~germoplasma/files/s6/Tomasni%20Campcosio.pdf>
- TORRES, R.** (1999). Flora intestinal, probióticos y salud. Editorial Gráfica Nueva, México.
- TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C.** (2007). Introducción a la Microbiología. 9^{na} Edición 2007. Editorial Médica Panamericana. Pp: 159-165.
- VANDENPLAS, Y.; MAYANS, J.; RAMÍREZ, G.; CASTAÑEDA, C.** (2002). Consenso sobre probióticos, agentes bioterapéuticos en el manejo de las diarreas. *Acta Pediátrica de México*, Vol. 23, N° 4, Julio – Agosto, 2002. Pp: 243-249.
- VÁSQUEZ, R.; COIMBRA, G.** (2002). Frutas Silvestres Comestibles de Santa Cruz. 2^{da} Edición. Santa Cruz, Bolivia. Editorial FAN. 265 p.
- VELASQUEZ, J.; GIRALDO, G.; PADILLA, L.; GIRALDO, Y.** (2015). Crecimiento de *Lactobacillus casei ssp casei* atcc 393 en suero clarificado, *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Vol. 13, No. 1, Enero – Junio. Pp: 19-27.
- YUKI, N.; WATANABE, K.; MIKE, A.; TANAKA, R.; MOROTONI, M.** (1999). Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota in the gastrointestinal tract: selective isolation from feces and identification using monoclonal antibodies. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 48, N°. 1. Pp: 51-57.
- ZAMORA, N.; JIMÉNEZ, Q.; POVEDA, L.** (2004). Árboles de Costa Rica. *INBio*, Vol. 3, Centro Científico Tropical. Conservación Internacional e Instituto Nacional de Biodiversidad. Pp: 553.

Anexos

PLAN DE CALIDAD PARA LA PRODUCCION DE BIOMASA DE *Lactobacillus casei* USANDO COMO SUSTRATO *Garcinia madruno*

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La desnutrición y las enfermedades gastrointestinales son dos (2) de las principales causas de muerte infantil en el mundo. Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) publica que cerca del 22% de las defunciones anuales de niños menores de cinco (5) años son causadas por diarrea crónica y enfermedades gastrointestinales, particularmente en países en vías de desarrollo (Balam *et al.*, 2002 y Forsberg *et al.*, 2007). La medicina tradicional y moderna hace del uso de alimentos fermentados como una alternativa para la prevención y tratamiento de estos y otros padecimientos (Holzapfel, 2002 y Vandenplas *et al.*, 2002), ya que su consumo proporciona una ruta de entrada común para agentes biológicos que conforman la flora intestinal benéfica, este tipo de microorganismos son conocidos como agentes probióticos (Argüelles *et al.*, 2000 y Fitzgerald *et al.*, 2006)

El uso de los microorganismos tiene una importante aplicabilidad en las industrias farmacéuticas y de alimentos (Gutiérrez. y Gamboa 2002), entre otros. Un biorreactor es, por tanto, un dispositivo biotecnológico que debe proveer internamente un ambiente controlado que garantice y maximice la producción y el crecimiento de un cultivo vivo, es decir, la parte biológica de este microorganismo. Externamente el biorreactor es la frontera que protege este cultivo del ambiente externo: contaminado y no controlado. El biorreactor debe, por tanto, suministrar los controles necesarios para que la operación o proceso (bioproceso) se lleve a cabo con economía, alto rendimiento (productividad) y en el menor tiempo posible, es decir la parte tecnológica (Valenzuela, 2012). Los procesos de cultivo de los microorganismos requieren de ambientes apropiados y para esto se necesita que ciertas variables (tales como concentración de nutrientes, pH y temperatura) sean cuidadosamente mantenidas en valores específicos o rangos pre-establecidos. Para el cultivo de microorganismos se utilizan usualmente biorreactores, los cuales son recipientes o sistemas que mantienen un ambiente biológicamente activo (Hemson, 2006).

Los biorreactores se clasifican, de acuerdo al modo de operación, en discontinuo, semicontinuo y continuo. En los biorreactores el modo de operación define el sistema de

cultivo del mismo y delimita la clasificación procesal-productiva del bioproceso (cultivo). Al operar un biorreactor en una determinada de esta clasificación, automáticamente queda determinado el modo de cultivo y se definen los parámetros y las características operativas y de diseño que intervienen en el proceso productivo del sistema.

Los probióticos son microorganismos vivos presentes en los alimentos los cuales al ser ingeridos, en cantidades suficientes, pueden ejercer una actividad fisiológica específica, beneficiando a la salud del individuo (Shah, 2001). Así un alimento que contiene especies probióticas es capaz de proteger al individuo de diferentes maneras:

- 4) Compitiendo por espacio físico y nutrientes
- 5) Produciendo sustancias antibióticas (bacteriocinas) activas frente a patógenos
- 6) Estimulando el sistema inmune del intestino y contribuyendo a la acidificación de contenido del colon, lo cual es desfavorable para el crecimiento de patógenos (Roberfroid, 2000).

Lactobacillus casei es una bacteria productora de ácido láctico que se emplea también en la industria láctea. Esta especie de lactobacilo es particularmente resistente a rangos amplios de pH (Yuki y col., 1999; Brink y Todorov, 2006). Adicionalmente, se ha referido que ***Lactobacillus casei*** mejora la capacidad de digestión, la tolerancia a la leche y evita la diarrea (Isolauri, 1991). Una larga lista de contribuciones ha documentado sus propiedades funcionales probióticas de ***Lactobacillus casei***: efecto antimicrobiano (Brink y Todorov, 2006), disminución de los niveles de colesterol y de las diarreas por infecciones gastrointestinales y coadyuvante en la digestión de la lactosa.

Los beneficios que trae la producción de la cepa ***lactobacillus casei***, a través de cultivo semicontinuo, son indiscutibles, sin embargo, hay excepción de la industria de los alimentos. Sólo unos pocos procesos comerciales de fermentación utilizan cepas silvestres aisladas directamente de la naturaleza. En la mayoría de los casos se utilizan cepas mejoradas específicamente para la producción de antibióticos, enzimas y otros metabolitos.

Aguirre-Ezkauriatza y Col (2009) presentan que el suero de leche desproteinizado por ultrafiltración es un sustrato adecuado (sin necesidad de suplementos con fuentes adicionales de carbono o nitrógeno) para obtener concentraciones en el orden de 3 a 4 g/L de biomasa probiótica de ***lactobacillus casei***. Una vez liofilizada esta biomasa tiene una viabilidad en el

orden de 1010 FC/g El proceso de fermentación propuesto es simple, requiriendo exclusivamente control de temperatura ($T=37^{\circ}\text{C}$) y pH (5.5). Dado que el producto principal del metabolismo de *Lactobacillus casei*, el ácido láctico, inhibe el desarrollo de biomasa, la estrategia de cultivo por lote alimentado se recomienda como la que preferentemente debe utilizarse (productividad de 0.46 g/ lhr)

Con el fin de diseñar procedimientos para su aprovechamiento biotecnológico, nuestro laboratorio ha desarrollado una herramienta para la inserción de genes metabólicos, por recombinación, en el suero de leche de la lactosa de *Lactobacillus casei* (Gosalbes *et al.*, 2000; Gosalbes *et al.*, 2001) a partir de la fermentación con cepas silvestres aisladas directamente de la naturaleza. En este sentido, Castillo (2008) realiza un análisis fitoquímico cuantitativo de la pulpa y cualitativo preliminar de la semilla y cáscara del arbusto del Madroño, con el propósito de generar estrategias de enseñanza para la comprensión, como muestra la Figura 1.

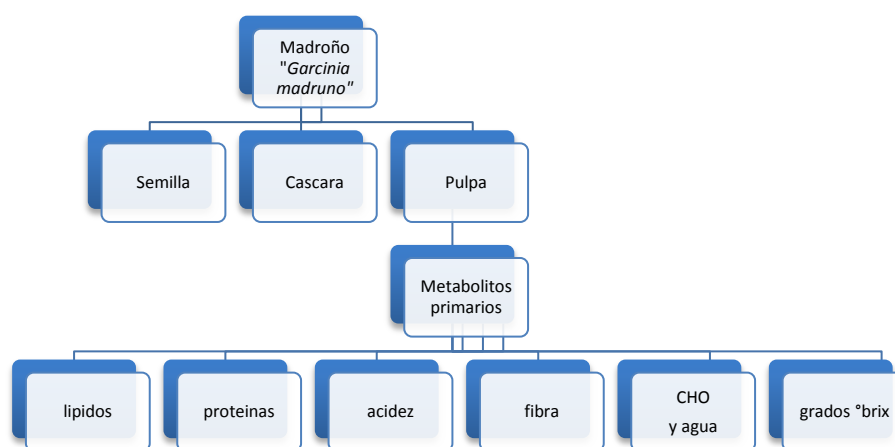


Figura 1. Esquema del análisis fitoquímico del Madroño

Fuente: Castillo (2008)

Bajo la misma investigación Castillo (2008) también realiza un análisis comparativo de las características fotoquímica de la pulpa del *Garcinia madruno* obteniendo unos resultado presentes en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación de las Características fotoquímicas de la pulpa del Madroño según su procedencia.

Análisis	Bogotá	Medellín	Popayán
% m/m	1992	1990	2007
Ceniza	0,2	0,1	0
Grasa	0,1	0,1	0,6
Fibra	1	1	0
CHO	9,9	5,7	13,3
Agua	88,3	88,3	84,3
Proteína	0,5	0,5	1,5
Kcal/100g Muestra	38,3	38,3	65,8
mg ácido Ascórbico /100g Muestra	10	10	3,12
pH	No referenciado	No referenciado	5,03

Fuente: Castillo 2008.

Cravo (2012) realizó la producción de biomasa de bacterias ácido lácticas, con un Biorreactor que tiene una capacidad de 2 l, al cual se le agregaron 1.5 l de sustrato (lactosuero), 8 gr del *Lactobacillus casei* liofilizado. Los materiales biológicos, vegetales, reactivos y aditivos fueron pesados de acuerdo a la corrida, se agregaron al recipiente del biorreactor para su simulación con temperatura 30°C, pH 4.5, 2.0 burbujeo y 200 rpm controladas; por un periodo de 9 hrs. El material biológico se activó por medio de la técnica de Pie de Cuba para garantizar su óptimo desarrollo en el medio de cultivo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los resultados a obtener en la investigación solo serán válidos para la producción de biomasa de la bacteria ácido láctica (*Lactobacillus casei*), utilizando como sustrato o medio de cultivo en el proceso *Garcinia madruno*, siendo este utilizado en la investigación como alimentación y hábitat del mismo. Con la simulación se pretende buscar una estrategia de control para lograr producir la mayor cantidad de biomasa para este proceso de crecimiento que es altamente no lineal.

El plan de calidad está diseñado para estudios que se realizarán con la utilización de un biorreactor modelo New Brunswick Scientific Co. INC, con capacidad de 1.5 l el cual consta de un suministro de aire, agitación y el controlador de temperatura.

El material biológicas, vegetales reactivos y aditivos se acondicionarán de acuerdo a las concentraciones de Glucosa, se agregarán en el recipiente del biorreactor para su inicio con temperatura controlada de 33.0°C y un pH de 4.5 por un periodo de 24 horas. Y se incubarán a 37°C para su desarrollo.

La técnica de siembra en placas se realizará a profundidad; proporcionándole las condiciones necesarias para su crecimiento y desarrollo debido a que es el manual de Medios de Cultivos establece que esta especie es estricta en nutrientes.

Fase I: Revisión y análisis de bibliografía sobre bioprocesos y control automático de cultivos semicontinuos.

Durante la fase I; se estudiará bibliografía relacionada con cultivos de *Lactobacillus Casei*, y se conseguirá información valiosa sobre modelos matemáticos de procesos de cultivos de este tipo. Así mismo, se realizará una revisión bibliográfica extensa sobre el estado del arte correspondiente al modelado, simulación y control automático de bioprocesos, especialmente para biorreactores semicontinuos.

Fase II: Elaboración de un modelo de un proceso de cultivo de la bacteria láctica del genero *lactobacillus casei*.

En la fase II, se seleccionará un modelo de un proceso de cultivo sin control automático. Se preparará el medio de cultivo caldo DE MAN, ROGOSA Y SHARPE (MRS), y Agar DE MAN, ROGOSA Y SHARPE (MRS); posteriormente se esterilizará todo el material en el autoclave para eliminar los microorganismo. En un lapso de 9 hrs se procederá a realizar el proceso semicontinuo en un biorreactor, agregando el sustrato, ácido cítrico, hidróxido de sodio (NaOH); con diferentes concentraciones de fructosa (15%,20%,25%), la siembra del *lactobacillus* se realizara a profundidad y por triplicado con la finalidad de obtener un conteo de las ufc/hrs. Las placas de Petri fueron incubadas a 37°C por un periodo de 72hrs.

Fase III: Simulación del modelo de un proceso de cultivo de la Bacteria *Lactobacillus Casei*. En la fase III, se simulará el modelo de cultivo seleccionado, sin control automático. Para ello se creará un software en Matlab que integre las ecuaciones, parámetros y condiciones del modelo. Se desarrollará un bloque de función S para Simulink, siguiendo la información presentada en Co (2004) y en The Math Works Inc. (2008-b).

Fase IV: Validación del funcionamiento del sistema de control adaptativo diseñado.

La validación de los resultados (fase IV) se realizará a través simulación del modelo matemático del proceso con el sistema de control en lazo cerrado, con ayuda de Simulink. Esto permitirá visualizar el comportamiento del sistema controlado.

Fase V: Documentación y presentación de resultados.

Una vez completada las fases anteriores, se redactarán las conclusiones y observaciones, y se completaran los informes sobre la investigación

El estudio se realizará con la utilización de un biorreactor modelo New Brunswick Scientific Co. INC, con capacidad de 1.5 l el cual consta de un suministro de aire, agitación y el controlador de temperatura.

El material biológicas, vegetales reactivos y aditivos se acondicionarán de acuerdo a las concentraciones de Glucosa, se agregarán en el recipiente del biorreactor para su inicio con temperatura controlada de 33.0°C y un pH de 4.5 por un periodo de 24 horas. Y se incubarán a 37°C para su desarrollo.

La técnica de siembra en placas se realizará a profundidad; proporcionándole las condiciones necesarias para su crecimiento y desarrollo debido a que es el manual de Medios de Cultivos establece que esta especie es estricta en nutrientes.

Preparación de los medios de cultivos.

Como lo establece en las normas COVENIN 1337-90, Utilizando las técnicas microbiológicas en el laboratorio de microbiología Aplicada; Se prepararán los medios de cultivo Agar MRS y Caldo MRS según el Manual de Cultivo Merck ART. Num 10660; ART. Num 10661, necesario para la siembra en las placas.

Preparación de Agar:

El Agar que se utilizará para la siembra será el Agar MRS, el cual es un medio utilizado solo para el enriquecimiento, cultivo y aislamiento de todas las especies de Lactobacillus; aparte del tipo de materiales de investigación, según DE MAN, ROGOSA Y SHARPE (1960).

De acuerdo a lo antes descrito, se prepara la cantidad de Agar a utilizar durante cada proceso, tomando en cuenta que se necesitaban 144 placas de Petri con 15 ml de Agar diluido por cada una, por lo tanto, se necesitara un volumen total de Agar 146gr.

- ❖ calculo de los gramos de Agar a utilizar:

144 placas con 15ml c/u
 $144 \times 15 = 2160$ ml de agua

- ❖ si se desea preparar:

$$\begin{array}{rcl} 67.15 \text{ gr de Agar} & \longrightarrow & 1000 \text{ ml} \\ X & \longleftarrow & 1500 \text{ ml} \\ x = 146 \text{ gr de Agar} \end{array}$$

Consecutivamente se diluirá el agar en el volumen de agua de 2160ml, inmediatamente se realizará la transferencia de calor hasta que ocurra un cambio de coloración indicando que está listo; se realizará con la ayuda de un mechero de Bunsen con constante agitación.

La muestra liquida que se obtendrá; se procede a agregar 15 ml en tubos de ensayo de 20ml. Una vez lleno los tubos de ensayo se procederá a su esterilización en el autoclave a 121°C y 15 lbs de presión por 15 min. Luego de ser esterilizado dicho medio se enfría hasta una temperatura aproximada de $45 - 50^{\circ}\text{C}$, Luego de acondicionar y homogenizar cuidadosamente el medio, se deja enfriar para después agregar acéticamente el mismo en las placas. Cuando se procede a sembrar en superficie se colocan los tubos de ensayo en baño de maría a 100°C , y dejar enfriar a temperatura cachete a para verterlo en las placas de Petri.

Preparación del caldo MRS.

El caldo MRS se utilizará para la preparación de las diluciones de las muestras a sembrar, con el objetivo de lograr cuantificar las unidades formadoras de colonias (ufc) presentes para

dicha muestra. Este medio se utilizará a una concentración de 1% (1 gr / 100 ml) de acuerdo a lo establecido en la norma COVENIN 1337 – 90.

Para cada concentración de glucosa se requiere preparar el caldo MRS necesario para un total de 36 frascos de vidrio con 90 ml por cada uno y 12 frascos de vidrio con 180 ml. Lo que indica que se necesita:

❖ **Para los frascos de 180:**

$$12 \times 180 \text{ ml} = 2160 \text{ ml}$$

$$36 \times 90 \text{ ml} = 3240 \text{ ml}$$

❖ **Para los frascos de 180ml:**

$$1 \text{ gr de caldo MRS} \longrightarrow 100 \text{ ml}$$

$$X \longleftarrow 2160 \text{ ml}$$

$$X = \frac{2160 \text{ ml} \times 1 \text{ gr caldo MRS}}{100 \text{ ml}} = 21,6 \text{ gr}$$

♦ **Los frascos de 90ml requieren:**

$$1 \text{ gr de caldo MRS} \longrightarrow 100 \text{ ml}$$

$$X \longleftarrow 3240 \text{ ml}$$

$$X = \frac{3240 \text{ ml} \times 1 \text{ gr caldo MRS}}{100 \text{ ml}} = 32,4 \text{ gr}$$

Una vez pesada la cantidad de caldo MRS a utilizar y medido el volumen de agua necesaria se disolverán las misma en un beaker de 5000 ml y se agregara en los frascos de vidrio en el volumen correspondiente para su posterior esterilización.

❖ **Preparación del sustrato (*Garcinia madruno*)**

- Se caracterizará el *Garcinia madruno* y se acondicionara.

- Se esterilizará para la eliminación de bacterias no deseadas por un periodo de 121°C por 15 minutos.
- Se deja que sedimentara para eliminar partículas.
- Se acondiciona para la activación o preparación del pie de cuba con el fin de activar al *Lactobacillus casei*.

Preparación del inóculo.

Darle las condiciones necesarias para activar la bacteria tomando en cuenta que estas células son exigentes en nutrientes, la cual se debe adaptarlas a las condiciones del sustrato.

- ❖ Se tomará 1500ml del total del sustrato en una fiola de 2000ml.
- ❖ Se calienta a 30C para que la bacteria no se vea afectada por el cambio de temperatura.
- ❖ Se agrega la *Lactobacillus casei*.
- ❖ Se tapa la boca de la fiola con algodón
- ❖ Se agita suavemente para que la bacteria se active.
- ❖ Y luego se agrega al recipiente del biorreactor.

Proceso biotecnológico (fermentación semicontinua)

Una vez preparados los medios de cultivo y la concentración de Glucosa, al igual que todo el material de vidrio a utilizar se da inicio al proceso de fermentación. En los siguientes pasos:

- ❖ Agregar el sustrato al recipiente de vidrio estéril del biorreactor, separando 1/5 del volumen total del sustrato para la preparación del inóculo.
- ❖ Encendido del equipo, con el fin de estabilizar la temperatura (33° C), pH (4.5), agitación (250 rpm) y aireación (2 pie³ /min) óptimos para el crecimiento y desarrollo de la bacteria (*Lactobacillus Casei*).
- ❖ Simultáneamente se activa la bacteria a una temperatura de 33°C antes de agregarla al fermentador.

- ❖ Simultáneamente se prepara el pie de cuba.
- ❖ Una vez activada la bacteria y estabilizada las condiciones del biorreactor, se incorpora el inóculo al sustrato.
- ❖ Las condiciones de operación son las siguientes: la temperatura (33° C), pH (4.5), agitación (250 rpm) y aireación (2 pie³/min). Estas condiciones son variables, fijas, controladas de forma continua a lo largo del proceso.

Al iniciarse el proceso 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_9). Esta toma de muestra consiste en extraer 20 ml del sustrato acondicionado inoculado con una pipeta de 25ml estéril y agregarlo en un frasco con 180 ml de caldo MRS y de esta manera se obtiene la dilución 10^{-1} debidamente homogenizada. Posteriormente se prepara la dilución 10^{-3} tomando 1 ml de la dilución anterior para añadirlo en un frasco con 90 ml de agua caldo MRS previamente preparada y esterilizada. De igual manera se continúan preparando las diluciones 10^{-5} , 10^{-7} .

Luego de preparar todas las diluciones se continua con la siembra en placas de Petri, la misma se realiza en profundidad y consiste en agregar 0.1 ml de la dilución correspondiente para luego agregar el agar MRS previamente fundido y enfriado.

La siembra se realiza 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 37° C por 5 días.

Recuento en Placas.

Es una técnica utilizada para estimar las unidades formadoras de colonias (ufc) presentes en una muestra. El recuento se realiza 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:

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

Cálculo de concentración de etanol.

Para este cálculo se utiliza la fórmula planteada por Gay – Lussac, el cual es una fórmula matemática basada en el porcentaje de alcohol y gas carbónico presente en una molécula de azúcar:

1 molécula de azúcar es = a 0,05134 de alcohol + 0,4816 gas carbónico. Pasteur estableció la ecuación de Gay – Lussac es válida para el 90 % de azúcar transformando, el resto lo forma otra sustancia como glicerol ácido succinico y ácido acético (Reynaud, 1989).

se estima la producción de etanol por cada hora de proceso de la siguiente manera:

$$\text{Etanol} = (^\circ \text{Brix I} - ^\circ \text{Brix F}) * 0.5134.$$

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.

Garcinia madruno o **Madroño:** es un árbol mediano originario de los bosques de Colombia, Venezuela y Panamá; sin embargo, se distribuye desde Costa Rica hasta Bolivia y Brasil. En Colombia

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, el microorganismo genera efectos farmacodinámicos semejantes a los fisiológicos de la flora intestinal normalmente equilibrada.

Lactobacillus casei es una bacteria productora de ácido láctico que se emplea también en la industria láctea.

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

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

Alcance del PLAN DE CALIDAD PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Lactobacillus casei* USANDO COMO SUSTRATO *Garcinia madruno*.

Este plan se aplicará para la producción de biomasa a partir de *Garcinia madruno* como sustrato, mediante procesos relacionados con la producción de biomasa de *Lactobacillus Casei*, microorganismo solicitado por el cliente. (Garantizar satisfacción del cliente).

Política de la Calidad

Misión

Dar un producto de excelente calidad que satisfaga las expectativas de nuestros clientes aplicando en todas nuestras acciones la filosofía de mejora continua.

Visión

Generar confianza a nuestros clientes, la comunidad como consecuencia de las implicaciones beneficiosas de la producción de biomasa y a la entrega de un producto de excelente calidad.

Objetivos de la Calidad

- ✓ Producir biomasa a partir de *Garcinia madruno*.
- ✓ Impulsar la mejora continua en busca de la excelencia.
- ✓ Producir biomasa con 95% de rendimiento en ufc.

FORMATO DE DISTRIBUCION DEL PERSONAL (FDP-010)

ORGANIGRAMA DE LA EMPRESA

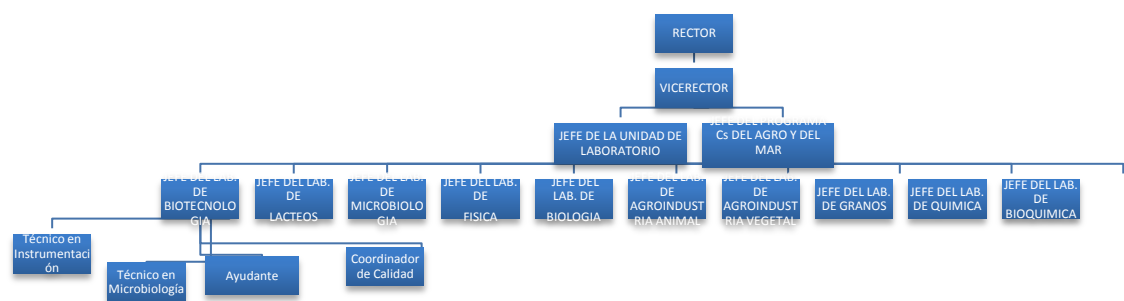


Figura 2. Organigrama de la Unellez

DIAGRAMA DEL SISTEMA

El plan de calidad para el proceso experimental de producción de *Lactobacillus casei* usando como sustrato *Garcinia madruno* en la producción. (Producción en laboratorio)

Bioreactor

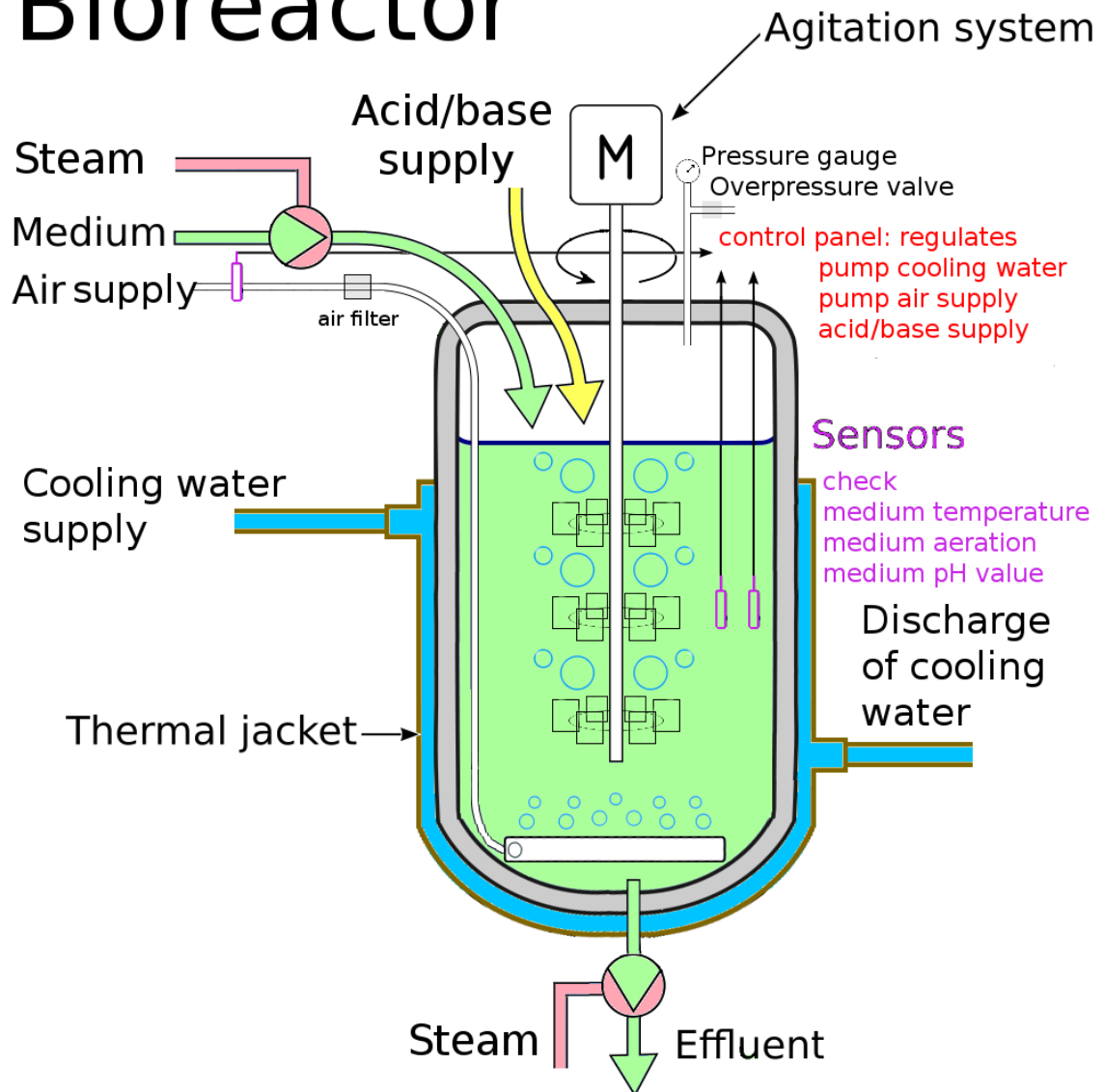


Figura 3. Corte de un Biorreactor

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 *Lactobacillus casei*.

Salida

Biomasa de *Lactobacillus casei* (masa húmeda) y desperdicios.

Elementos de entrada del plan de la calidad

Solicitud del cliente. **Formato SC-01**

Estandarización del sustrato según norma interna **NIE-10**

Formato de materiales y equipos. MEQ-10

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 10 ml, 50 ml, 250 ml.
- 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.

- 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 MRS.
- Caldo nutritivo.

Otros:

- Antibiótico.
- 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.
- Papel aluminio.
- Pizetas.
- Plancha eléctrica.
- Porta placas.
- Porta pipetas.

- Soportes universal.
- Tapa boca.
- Tijeras.

Recursos humanos

Uno (1) jefe del laboratorio de biotecnología.

Uno (1) Instrumentista.

Uno (1) Microbiólogo.

Uno (1) técnico de laboratorio.

Uno (1) mantenimiento.

Infraestructura y ambiente de trabajo

El ambiente de trabajo debe ser total mente aséptico, con un grado de protección biológica tipo dos (2)

El mismo debe constar de una cámara de sembrado de flujo laminar.

La temperatura ambiente de trabajo debe ser de 25°C según norma interna del laboratorio.

Prácticas especiales.

Nivel 2 de Bioseguridad.

Norma según Rosandra M.2003

1. El acceso al laboratorio será limitado o restringido por el director o jefe del mismo cuando se encuentren en curso tareas que involucren manejo de agentes infecciosos. En líneas generales, las personas que se hallen en alto riesgo de adquirir una infección no deberán ser admitidas ni en este tipo de dependencia ni en las áreas donde se manipulen animales infectados con agentes pertenecientes a este nivel; por ejemplo, los sujetos

inmunocomprometidos o inmunosuprimidos se encuentran en alto riesgo de adquirir infecciones por este tipo de microorganismos; en estos casos, el jefe del laboratorio tendrá la última palabra y la responsabilidad de permitir quién puede entrar y trabajar en ese tipo de dependencia.

2. El jefe o director de este tipo de laboratorios deberá establecer políticas y procedimientos que aseguren que solamente personal consciente del potencial riesgo, dotado de requerimientos específicos, por ej. inmunizaciones, podrá acceder a este tipo de laboratorio.

3. Cuando el microorganismo infeccioso que se manipule en determinada dependencia requiera de medidas especiales para su ingreso, como inmunizaciones, deberá colocarse en su puerta, en tamaño adecuado, el símbolo de riesgo biológico, acompañado por el nombre del agente infeccioso y de la persona responsable del laboratorio, con su respectivo número telefónico.

4. Todo el personal que trabaje en este tipo de dependencias deberá recibir las respectivas inmunizaciones y evaluaciones para los agentes que manipule o que pudieran estar potencialmente presentes en el área (ej.: vacuna de la hepatitis B, prueba de la tuberculina, entre otros,).

5. Es recomendable tomar muestras periódicas de suero de todo el personal que labore en este tipo de dependencias, además de la muestra base extraída cuando ingresan por primera vez a las mismas, con la finalidad de poder medir anticuerpos contra el o los agentes que se manipulan en el área, a medida que transcurre el tiempo.

6. Cada laboratorio deberá preparar y adoptar un manual de bioseguridad, obligando al personal que labora en el mismo a leerlo con sumo cuidado y a seguir todas las instrucciones indicadas para las diferentes prácticas y procedimientos empleados.

7. El personal de este tipo de laboratorios deberá recibir previamente un adecuado adiestramiento en el manejo de los potenciales riesgos asociados con las tareas que realiza, así como en las precauciones a tomarse para prevenir exposiciones o en los procedimientos para evaluar situaciones en caso de accidentes. También deberá recibir actualizaciones

anuales o adiestramiento adicional, de ser necesarios, o en casos de cambios en la política del laboratorio.

8. Con la manipulación de objetos cortantes, incluyendo agujas, jeringas, pipetas capilares de vidrio, laminas porta y cubre objetos, escalpelos, bisturíes, etc., deberán adoptarse estrictas precauciones. Los mismos deberán utilizarse solamente cuando no existan otras alternativas disponibles. Igualmente, en lo referente a material de vidrio, en lo posible debe ser reemplazado por utensilios plásticos. Extremas precauciones deberán ser observadas en el manejo de muestras y procedimientos en animales, tales como inoculaciones parenterales, flebotomías, o aspiraciones de fluidos.

a. Solamente deberán utilizarse jeringas desechables con agujas de una sola unidad, que no puedan separarse, tanto para la inoculación como para la aspiración de material infeccioso. En caso de utilizarse dispositivos de dos piezas, nunca se tratará de separar la aguja de la jeringa, desecharla en recipientes de paredes rígidas, conjuntamente con todo el resto de material cortante. Todo este material, reunido en contenedores resistentes, deberá ser transportado al área de descontaminación, preferiblemente mediante autoclave.

b. Materiales de vidrio rotos nunca serán manipulados con las manos; deberán ser utilizados para ello instrumentos mecánicos, tales como pinzas, cepillos, etc. Todo este material cortante ya utilizado, así como vidrios rotos, deberán ser descontaminados antes de proceder a su desecho, de acuerdo a la legislación vigente en cada país

9. Todo cultivo, tejidos, especímenes o fluidos biológicos, deberán ser colocados en contenedores resistentes, que no permitan derrames, durante su recolección, manejo, procesamiento, almacenamiento, transporte o envío a otras dependencias.

10. Tanto el equipo de laboratorio como la superficie de trabajo deberán ser descontaminados con un desinfectante adecuado para este tipo de microorganismo después de cada procedimiento con muestras que se presumen infecciosas, de manera especial cuando se sospecha de salpicaduras, o después de un accidente por derrame. Equipos contaminados que se hayan dañado, antes de ser enviados a mantenimiento o reparación, deberán ser descontaminados, de acuerdo a las normas establecidas para cada país.

11. Las salpicaduras u otros accidentes que se traduzcan en exposición directa al material contaminado, de parte del operador, deberán ser inmediatamente reportados al Director o jefe del laboratorio. Dicha persona deberá ser sometida a evaluación médica, seguimiento y tratamiento, llevándose un registro minucioso de cada paso.

Equipo de seguridad o barreras primarias.

1. Deberán emplearse cabinas de bioseguridad adecuadamente condicionadas, preferiblemente de clase II o, en su ausencia, un equipo protector personal adecuado, cuando se trata de las siguientes actividades:

- Procedimientos que puedan producir aerosoles infecciosos o salpicaduras; por ej.: centrifugación, homogeneización, trituración de muestras, mezclado, ruptura por ultrasonido, apertura de contenedores con material infeccioso con presión interna diferente a la ambiental, inoculación intranasal de animales, cosecha de tejidos o fluidos de animales o huevos infectados.

- Empleo o manipulación de altas concentraciones o grandes volúmenes de agentes infecciosos. Dicho material sólo puede centrifugarse en laboratorios abiertos si se dispone de rotores, cabezales y envases cerrados. En caso de ser abiertos, deben procesarse en cabinas de bioseguridad.

2. El empleo de dispositivos para la protección facial es de suma utilidad en los casos de riesgo de salpicaduras o pulverizaciones de material infeccioso, cuando el mismo es manipulado fuera de cabina.

3. En este tipo de laboratorios será de uso obligatorio la bata larga, gorro y tapabocas. Toda esta indumentaria deberá ser retirada y dejada en la dependencia laboral antes de visitar otras áreas, como cafetería, biblioteca, oficinas administrativas, etc. Todo este material, una vez utilizado, deberá ser enviado a la lavandería de la institución; nunca llevado al hogar del operador.

4. Para el manejo de animales infectados, material infeccioso y material o equipos contaminados, es indispensable el uso de guantes. En caso de tareas de alto riesgo, será recomendable el empleo de dos pares de guantes; así, al ocurrir una salpicadura o rotura de algún envase, las manos quedarán protegidas al retirar el primer par de guantes. Éstos deberán ser removidos en el área de trabajo y nunca sacarse de él; tampoco deberán ser lavados ni reusados.

Facilidades del laboratorio o barreras secundarias.

1. Todo laboratorio de este nivel deberá estar equipado obligatoriamente con una toma de agua con su lavamanos.
2. Su diseño deberá ser lo más funcional posible, a fin de poder ser limpiado fácilmente. Debido al riesgo de derrames o salpicaduras con material infeccioso, deberá evitarse el uso de alfombras en estas dependencias.
3. Los topes de los mesones de trabajo deberán ser impermeables al agua y resistentes a los ácidos, álcalis, solventes orgánicos y calor moderado.
4. Los muebles del laboratorio deberán ser lo más sencillo posible, con suficientes espacios entre ellos y las cabinas, a fin de facilitar su limpieza, evitando lugares inaccesibles.
5. Si el laboratorio está dotado de ventanas que puedan abrirse, deberán estar equipadas de mallas, para evitar el ingreso de insectos al área.
6. En el área adyacente a este tipo de laboratorio deberán existir las facilidades para la descontaminación de desechos contaminados; por ej.: autoclave, desinfección química, incinerador u otro tipo de dispositivo.
7. Un equipo para lavado rápido de ojos deberá ser fácilmente accesible en este tipo de dependencia.

QPL-001	Producto/Línea de Producto: Biomasa de <i>Lactobacillus Casei</i> , a partir <i>Garcinia madruno</i>	Originado por: Ing. Gabriel Cravo	Aprobado por:	Rev: 01	08/12/2012
---------	--	--------------------------------------	---------------	---------	------------

Actividad	Descripción	Documento/ Procedimiento	Área/ Dpto.
Alcance	Este plan se aplicara para la producción de biomasa a partir de <i>Garcinia madruno</i> como sustrato, mediante procesos relacionados con la producción de biomasa de <i>Lactobacillus Casei</i> , microorganismo solicitado por el cliente. (Garantizar satisfacción del cliente)		
Objetivos de la Calidad	✓ Producir biomasa a partir de <i>Garcinia madruno</i>. ✓ Impulsar la mejora continua en busca de la excelencia. ✓ Producir biomasa con 95% de rendimiento en ufc.		
Responsabilidades de la dirección	El responsable del plan de calidad es el jefe del laboratorio, el mismo debe asegurar que el sistema de gestión de la calidad para cumplir la solicitud del cliente sean planificada, implementadas y controladas, y se dé seguimiento a su progreso, autorizar peticiones para exenciones de los requisitos del sistema de gestión de la calidad de la organización El técnico del laboratorio debe comunicar los requisitos y funciones, subcontratistas y clientes afectados, y de resolver problemas que surjan en las interfaces entre dichos grupos, revisar los resultados de cualesquiera	FDP-010	

	auditorias desarrolladas. El instrumentista; controlar las acciones correctivas y preventivas, revisar y autorizar cambios, o desviaciones, del plan de la calidad. Los canales de comunicación de aquellos involucrados en la implementación del plan de la calidad pueden ser presentados en forma de diagrama de flujo.		
Documentación	La recolección de datos de cuentas de M.O se tendrá mediante formato RCD-100. El formato para llevar el registro de variables como: pH, temperatura, °Brix, volumen gastado de base y ácido, FRV-121.	RCD-100 FRV-121	
Registros	Los datos serán recogidos por el técnico del laboratorio y serán luego los colocara en una data. Cada 5 minutos se hará un registro de las variables y se colocaran en una pc. El instrumentista junto con microbiólogo podrá cambiar el diseño de inicial según sea el comportamiento de la cepa y ajustar la temperatura del biorreactor, pH, agitación y burbujeo, con el fin de asegurar el cumplimiento de los requisitos hechos por el cliente. El registro de la corrida se mantendrá y se llevara de manera estadísticas con el fin de visualizar en el tiempo los alcances.		
	Materiales de vidrio: Fiola de 250ml y 1000 ml, 200ml, Beaker (250ml, 1000 ml), Tubos de prueba de 15x 150mm, Termómetros de vidrio, Embudos, Pipetas de 1ml, 25 ml, celdas de vidrio para el Espectronic 20 D, cilindros graduados 10 ml, 50 ml, 250 ml, frascos para diluyentes con capacidad de 350 ml, matraz de 250 ml, 500 ml		

Recursos	y 1000 ml, placas de Petri (100 x 15mm), bureta de 50 ml y precisión 0.1 ml, varillas de vidrio, vasos de precipitado, recipiente del biorreactor. Equipos: Autoclave, balanza digital de capacidad 150gr máximo, con sensibilidad 0,1gr, balanza digital de capacidad 350 gr 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 MRS, Caldo nutritivo. Otros: Antibiótico, 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, papel aluminio, pizetas, plancha eléctrica, porta placas, porta pipetas, soportes universal, tapa boca, tijeras. Recursos humanos: Uno (1) jefe del laboratorio de biotecnología, Uno (1) Instrumentista, Uno (1) Microbiólogo, Uno (1) técnico de laboratorio, Uno (1) mantenimiento.		
Revisión de requisitos/Especificaciones del Cliente	Requisitos		

	Es requisito del plan cumplir con: • Rendimientos mayores al 95 %. • 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.		
Comunicación con el cliente	La comunicación con el cliente se hará de manera escrita y visitas al cliente.		
Diseño y desarrollo	El plan debe tener en cuenta las especificaciones de crecimiento del microorganismo solicitado por el cliente en este caso <i>Lactobacillus Casei</i> las condiciones de operación son las siguientes: la temperatura (33° C), pH (4.5), agitación (250 rpm) y aireación (2 pie³/min). Estas condiciones son variables, fijas, controladas de forma continua a lo largo del proceso El plan debe garantizar la esterilización <i>Garcinia madruno</i> a 121 ° C por 15 min y a 15 lbs de presión. Para el Recuento del microorganismo se incuban las placas en una estufa de		

	existir una Necesidad de gestionar los cambios a los diseños existentes.		
Compras	El plan contempla la evaluación a sus proveedores (formato FEPL-100) 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>Lactobacillus Casei</i> (FCI-150).	FEPL-100	
Producción	La organización planificará y llevara a cabo la producción de biomasa de <i>Lactobacillus Casei</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.	FIT-020	
Identificación y trazabilidad	Para mantener la trazabilidad se establecerá un sistema de identificación de la materia prima, los recursos, entre otros, para ello se llevara un registro (formato FRP), donde se anotara 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 levantara la información referente a los equipos birreactor, microscopios, neveras, autoclave, etc.	FRP	
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	PNO	

	la información ahí contenida. 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.		
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		
Productos no conformes	Se contempla que el producto no conforme se eliminará en el autoclave por ser un producto de procedencia biológica.		
Seguimiento y medición	Se realizará un monitoreo de los grados Brix cada 5 min y una siembra para observar el crecimiento de <i>Lactobacillus Casei</i> 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	
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		
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.		

modelo plan

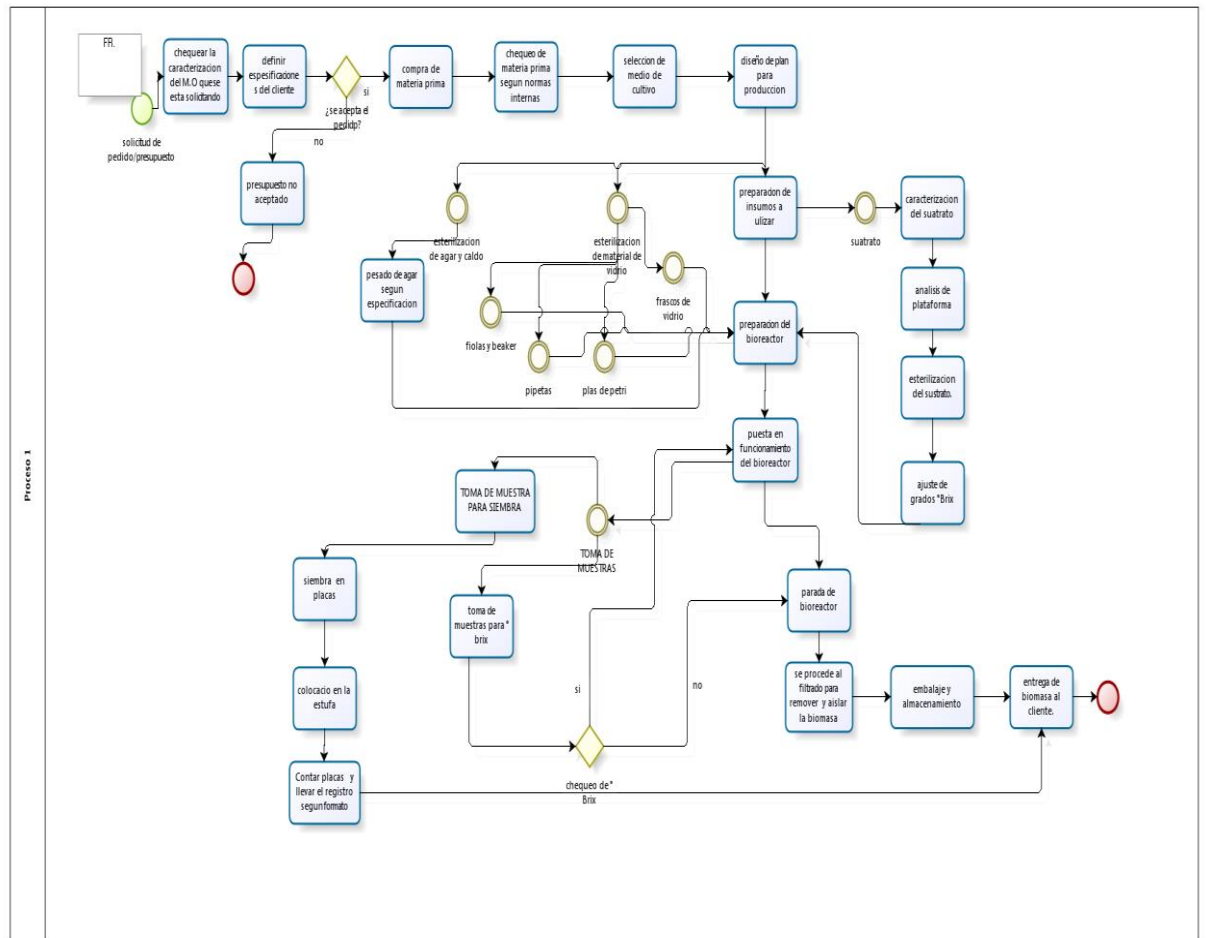
Bizagi Process Modeler

Tabla de Contenidos

1	<u>DIAGRAMA 1</u>	153
1.1	<u>Proceso 1</u>	154
1.1.1	<u>Elementos del proceso</u>	154
1.1.1.1	 <u>solicitud de pedido/presupuesto</u>	154
1.1.1.2	 <u>chequear la caracterizacion del M.O que se esta solicitando</u>	154
1.1.1.3	 <u>definir espesificaciones del cliente</u>	154
1.1.1.4	 <u>¿se acepta el pedidp?</u>	154
1.1.1.5	 <u>compra de materia prima</u>	154
1.1.1.6	 <u>chequeo de materia prima segun normas internas</u>	154
1.1.1.7	 <u>seleccion de medio de cultivo</u>	154
1.1.1.8	 <u>diseño de plan para produccion</u>	154
1.1.1.9	 <u>preparacion de insumos a ulizar</u>	154
1.1.1.10	 <u>esterilizacion de material de vidrio</u>	154
1.1.1.11	 <u>pipetas</u>	154
1.1.1.12	 <u>plas de petri</u>	155
1.1.1.13	 <u>frascos de vidrio</u>	155
1.1.1.14	 <u>fiolas y beaker</u>	155
1.1.1.15	 <u>suatrato</u>	155
1.1.1.16	 <u>caracterizacion del suatrato</u>	155
1.1.1.17	 <u>analisis de plataforma</u>	155
1.1.1.18	 <u>esterilizacion del sustrato</u>	155
1.1.1.19	 <u>ajuste de grados °Brix</u>	155
1.1.1.20	 <u>esterilizacion de agar y caldo</u>	155

<u>1.1.1.21</u>	 <u>pesado de agar segun especificacion</u>	155
<u>1.1.1.22</u>	 <u>preparacion del bioreactor</u>	155
<u>1.1.1.23</u>	 <u>puesta en funcionamiento del bioreactor</u>	155
<u>1.1.1.24</u>	 <u>TOMA DE MUESTRAS</u>	155
<u>1.1.1.25</u>	 <u>TOMA DE MUESTRA PARA SIEMBRA</u>	155
<u>1.1.1.26</u>	 <u>siembra en placas</u>	155
<u>1.1.1.27</u>	 <u>colocacio en la estufa</u>	155
<u>1.1.1.28</u>	 <u>Contar placas y llevar el registro segun formato</u>	156
<u>1.1.1.29</u>	 <u>entrega de biomasa al cliente</u>	156
<u>1.1.1.30</u>	 <u>toma de muestras para °brix</u>	156
<u>1.1.1.31</u>	 <u>chequeo de °Brix</u>	156
<u>1.1.1.32</u>	 <u>parada de bioreactor</u>	156
<u>1.1.1.33</u>	 <u>se procede al filtrado para remover y aislar la biomasa</u>	156
<u>1.1.1.34</u>	 <u>presupuesto no aceptado</u>	156
<u>1.1.1.35</u>	 <u>Elemento</u>	156
<u>1.1.1.36</u>	 <u>embalaje y almacenamiento</u>	156
<u>1.1.1.37</u>	 <u>Elemento</u>	156

DIAGRAMA 1



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 biorreactor



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

☐ embalaje y almacenamiento

☐ Elemento

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, J. y Rivas, F. (2001). Introducción a las Técnicas de Control Inteligente. Editores Universidad de los Andes.

Aguirre, E.; Ramírez, A.; Aguilar, M.; Álvarez, M. (2009). Producción de proteína y biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra. 1, 69-76.

Balam, P.; Ochoa, E.; Sonda, O. (2002). Perfil de Mortalidad en el Estado de Yucatán, México. *Biomédica*, 13, 1-8.

Balestrini (2001). Modalidad de proyecto factible. Caracas, BL Consultores y Asociados. Servicio Editorial, Quinta Edición.

Brink, M.; Todorov, D.; Martin, H.; Senekal, J. and Dicks, T. (2006). Propiedades funcionales probióticas de *Lactobacillus casei*: efecto antimicrobiano.

E. J. Aguirre-Ezkauriatza y col. (2009). PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA Y BIOMASA PROBIÓTICA DE *Lactobacillus casei* LIOFILIZADAS A PARTIR DE SUERO DE LECHE DE CABRA

Gutiérrez, S. y Gamboa, M.(2002).IDENTIFICACIÓN MICROBIANA, revisión (2008).

CAMPBELL, N., REECE, J. (2008). Biology. 8th edition. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Co, T. (2004). Short Tutorial on Matlab. Michigan Technological University.

Cravo, G. (2012) Estrategias para el diseño de un control adaptativo en producción de bacterias ácido lácticas. Revista agrollania Vol 09. pag.62.

Escobar, L. Rojas, C. Giraldo, G. Sanabria, L. (2010).Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus Casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno.

Fitzgerald, R. J.; Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides concentration of *Aloe vera* plants exposed to three and lactic fermentations. *International Journal of Environmental and Experimental Dairy Technology* 59, 118-125.

Forsberg, B. Petzold, M. Tomson, G. Allebeck, P. (2007). Diarrhea case management in low- and middle- income countries- an unfinished agenda. Bulletin of the World Health Organization 85, 42-50.

Gosalbes, F. (2001). Inserción de genes metabólicos, por recombinación, en el suero de leche de la lactosa de *L. casei*. *Lait* 81: 29 35: 29.

Holzappel, W. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. International journal of food microbiology 75, 197-213

Jansens, R.G. (1984). Ethanol from Whey: Continuous Fermentation with Cell Recycle. Biotechnol, and Bioeng., 26, 1-5.

Matsuzaki, (2008). Estimular el sistema inmune mediante el probiótico *Lactobacillus casei*. Immunol Cell Biol, 78: 67-73.

Ortiz. (2008). Estimular el sistema inmune mediante el probiótico *Lactobacillus casei*. British Journal of Nutrition 1, 1-12.

Rodrigo, Leclercq R. (2005). El rol de los prebióticos, probióticos y simbióticos en gastroenterología; Vol. 16, Nº 3: 218-228.

Sharpe. (1962). Manual de medio de cultivo con Agar MAN RAGOSA Y SHARPE (MRS) y caldo MAN ROGOSA Y SHAPE (MRS).

Soto. (2005). Evaluación de Factibilidad de un Proceso Biológico del Suero de Leche. Revista mexicana de Ingeniería Química, Vol. 4, 59 - 74.

Valenzuela, C. (2012). Huancayo Perú. REACTOR BIOLOGICO ANAEROBIO TIPO FILTRO.

Yuki, Watanabe, K., Mike, A., Tanaka, R., Morotoni, M.(1999). Brink y otros, (2006) evaluar la resistencias a rangos amplios de pH del *lactobacillus*. *International Journal of Food Microbiology* 48 (1), 51-57.

<http://www.mathworks.com/products/matlab/sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>.

<http://www.scribd.com/doc/8983289/tipos-de-biomasa>.

<http://www.biologia.edu.ar/.../cultivo%20y%20biorreactores.htm>

<http://www.nutricion.pro/14-07-2008.../l-casei-que-es>.

http://www.alimentosargentinos.gov.ar/.../lacteos_sueros_lecheria.com

<http://bioreactores.wordpress.com/2008/07/16/clasificacion-de-bioreactores/>



Gabriel Rolando Cravo León, Profesor Asociado adscrito 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 UNELLEZ Venezuela, recibió los títulos de Ingeniero Agroindustrial e Ingeniero Civil. Doctor en Ciencias de la Ingeniería, mención Productividad de la UNEXPO, Barquisimeto Venezuela (2020). Es autor de 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. Investigador PEII (NIVEL A1). En la UNELLEZ se ha desempeñado en cargos directivos como Coordinador Enlace de la Dirección de Infraestructura de los Espacios Físicos. Asimismo, ha ocupado importantes cargos directivos en empresas públicas y privadas como Coordinador Administrativo en el Instituto Nacional de Vivienda y Hábitat-INAVI e Inspector de Obras Civiles en GELCA, Ingenieros Consultores. Actualmente es director de la Revista AGROLLANÍA de Ciencia y Tecnología del Vice-Rectorado de Infraestructura y Procesos Industriales de la UNELLEZ. Tutor y jurado evaluador de los programas de Maestrías y Doctorados impartidos en la UNELLEZ San Carlos.