

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE INGENIERÍA
INGENIERÍA QUÍMICA, PETROQUÍMICA, AMBIENTAL Y ALIMENTOS**



PROYECTO DE GRADO

ELABORACIÓN Y VALIDACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS DE UN CULTIVO CONTINUO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA A TRAVÉS DE LA CONSTRUCCIÓN DE UN PROTOTIPO DE QUIMIOSTATO Y LA ADQUISICIÓN DE DATOS DEL PROCESO CON EL USO DE MICRO-CONTROLADORES

PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

PRESENTADO POR:

Oliver Mendoza Paco

TUTOR:

Ing. Marcelo Gorrity Portillo

La Paz – Bolivia

2019



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE INGENIERIA**



LA FACULTAD DE INGENIERIA DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS AUTORIZA EL USO DE LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO SI LOS PROPÓSITOS SON ESTRICTAMENTE ACADÉMICOS.

LICENCIA DE USO

El usuario está autorizado a:

- a) Visualizar el documento mediante el uso de un ordenador o dispositivo móvil.
- b) Copiar, almacenar o imprimir si ha de ser de uso exclusivamente personal y privado.
- c) Copiar textualmente parte(s) de su contenido mencionando la fuente y/o haciendo la cita o referencia correspondiente en apego a las normas de redacción e investigación.

El usuario no puede publicar, distribuir o realizar emisión o exhibición alguna de este material, sin la autorización correspondiente.

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS. EL USO NO AUTORIZADO DE LOS CONTENIDOS PUBLICADOS EN ESTE SITIO DERIVARA EN EL INICIO DE ACCIONES LEGALES CONTEMPLADAS EN LA LEY DE DERECHOS DE AUTOR.

Dedicatoria:

A mi familia por la confianza depositada:

Ramón Mendoza Mollinedo - Padre

Julia Paco Padilla - Madre

Jeaneth Mendoza Paco - Hermana

Elvis Mendoza Paco - Hermano

Davis Mendoza Paco - Hermano

Malena Valencia Ramos - Cuñada

Jorge G. Aguilar - Cuñado

*A mi pareja Jimena K. Blanco Callisaya e
hijo Dylan O. Mendoza Blanco quienes son mi
razón de superación.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la sabiduría y fuerza que me da para sobrellevar los problemas del día a día.

A mis padres Ramón Mendoza M. y Julia Paco P. por todo el esfuerzo y confianza depositada durante este periodo de crecimiento, gracias a ellos he recibido la mejor formación educativa y emocional para confrontar todas las pruebas que se presenten a futuro.

A mis hermanos: Jeaneth, Elvis, Davis, Malena y Jorge, que siempre están colaborándome para que cumpla mis objetivos trazados.

A mi pareja Jimena K. Blanco Callisaya por ser el pilar fundamental para el desarrollo y culminación de todos los proyectos y logros obtenidos.

A mi nueva familia: Gonzalo Blanco, Ines Callisaya, Gustavo Blanco y Melany Blanco, por toda la ayuda brindada para la elaboración de este proyecto, además de otras actividades.

A mi tutor Ing. Marcelo Gorritty Portillo, quien brindó su apoyo desde un inicio y supo direccionar el presente Proyecto de Grado, gracias a su catedra inculcada fue posible desarrollar el presente proyecto.

A mi tribunal, Ing. Jesús Góngora Beltrán e Ing. Álvaro Rafael García Padilla, por brindarme su tiempo y recomendaciones para optimar el presente documento.

Finalmente agradecer a los amigos y a cada una de las personas que me brindaron su colaboración a lo largo de esta etapa tan importante, cada consejo recibido ayudó a alcanzar los objetivos planteados.

RESUMEN

El cultivo de microorganismos puede ser realizado por medio de diferentes técnicas que requiera la Unidad de estudio, el presente Proyecto de Grado pretende elaborar y validar modelos matemáticos para cultivar microorganismos de forma continua a través de un prototipo de Quimiostato (construido) que permita la obtención de datos del sistema haciendo uso de microcontroladores, utilizando a las especies de *Lactobacillus Bulgaricus* y *Streptococcus Thermofilus* como fuente generadora de microorganismos.

Un Quimiostato es un biorreactor que proporciona un ambiente biológicamente activo y controlado que permite el crecimiento eficaz de las células y la formación de un producto; el medio ambiente adecuado, tiene niveles óptimos de parámetros específicos como: temperatura, pH, sustratos, sales y oxígeno disuelto; este proceso puede ser aerobio o anaerobio.

Los microorganismos dentro del Quimiostato crecen a un ritmo constante en la medida en que los nutrientes son suministrados. Manipulando el flujo de nutrientes, es posible cambiar las tasas de crecimiento. Finalmente se llega a una tasa de crecimiento máximo, en el cual se considera un sistema estacionario.

Dentro del Quimiostato se realizaron análisis del Sistema de Cultivo Batch, Sistema Cultivo Feed-Batch y Sistema de Cultivo Continuo, los cuales permitieron identificar los modelos matemáticos que se asemejan al comportamiento de los sistemas.

El crecimiento de los microorganismos fue representado por diferentes fases: latencia, aceleración, exponencial, desaceleración, estacionaria y decadencia, determinadas por medio de la ecuación de Monod de acuerdo a las condiciones de la fase en la que se encuentre.

La construcción del prototipo fue realizado con material plástico y no acero inoxidable con la finalidad de no incurrir en altos costos del proyecto de modo que el proyecto sea alcanzable por diferentes personas que deseen incursionar en la construcción de prototipos.

Se utilizó microcontroladores de la Plataforma ARDUINO (Sensor de Nivel, Sensor de Temperatura, Sensor de Flujo, Sensor de Turbidez, Relay, Sensor pH-metro) como instrumentos de medición de las variables del proceso, la factibilidad de estos dispositivos electrónicos radica en que son de código abierto (open source), por lo que su programación es a requerimiento de la Unidad de Estudio.

La importancia de la instrumentación en el prototipo construido radica en la necesidad de tener los cultivos controlados con el fin de optimizar el proceso, la estrategia de control comienza con la medición de las variables de forma constante para garantizar un ambiente adecuado del proceso de estudio.

Con los datos obtenidos a través de los micro-controladores se elaboró modelos matemáticos para la producción de biomasa en los sistemas: Cultivo Batch, Cultivo Feed Batch y Cultivo Continuo por medio de un balance de masa, los cuales fueron validados experimentalmente a través del prototipo de Quimiostato.

Se desarrolló un diseño experimental 3^2 tomando como factores la temperatura y el porcentaje de adición de cultivo con tres niveles de prueba cada uno, con la finalidad de corroborar el valor bibliográfico en cuanto a la adición de cultivo, concluyendo que el porcentaje de adición 3-5% es el suficiente para obtener rendimientos aceptables de producción, menor al 3% incrementa el tiempo de producción, mayor al 5% incurre en sobregasto de cultivo con un rendimiento similar.

Con los modelos matemáticos elaborados y los datos experimentales obtenidos, se obtiene la gráfica de cultivo continuo en el cual se observa la variación de la concentración máxima a la tasa de dilución de 0.47 [1/hr].

SUMMARY

The cultivation of microorganisms can be carried out through different techniques required by the Study Unit, this Degree Project aims to develop and validate mathematical models to cultivate microorganisms continuously through a prototype of Chemostat (built) that allows obtaining of system data using microcontrollers, using the species of *Lactobacillus Bulgaricus* and *Streptococcus Thermofilus* as a source of microorganisms.

A Chemostat is a bioreactor that provides a biologically active and controlled environment that allows the effective growth of cells and the formation of a product; the right environment has optimal levels of specific parameters such as: temperature, pH, substrates, salts and dissolved oxygen; This process can be aerobic or anaerobic.

The microorganisms inside the Chemostat grow at a constant rate to the extent that nutrients are supplied. By manipulating the flow of nutrients, it is possible to change growth rates. Finally, a maximum growth rate is reached, in which a stationary system is considered.

Within the Chemostat, analyzes of the Batch Cultivation System, Feed-Batch Cultivation System and Continuous Cultivation System were carried out, which allowed us to identify the mathematical models that resemble the behavior of the systems.

The growth of the microorganisms was represented by different phases: latency, acceleration, exponential, deceleration, stationary and decay, determined by means of the Monod equation according to the conditions of the phase in which it is found.

The construction of the prototype was made with plastic material and not stainless steel in order not to incur high project costs so that the project is attainable by different people who wish to venture into the construction of prototypes.

Microcontrollers of the ARDUINO Platform (Level Sensor, Temperature Sensor, Flow Sensor, Turbidity Sensor, Relay, pH-meter Sensor) were used as instruments for measuring process variables, the feasibility of these electronic devices is that They are open source (open source), so their programming is at the request of the Study Unit.

The importance of instrumentation in the built prototype lies in the need to have controlled crops in order to optimize the process, the control strategy begins with the measurement of variables constantly to ensure an adequate environment of the study process.

With the data obtained through the micro-controllers, mathematical models for the production of biomass in the systems were developed: Batch Culture, Feed Batch Culture

and Continuous Cultivation through a mass balance, which were experimentally validated through the prototype Chemostat

An experimental design 32 was developed taking as factors the temperature and the percentage of crop addition with three test levels each, in order to corroborate the bibliographic value in terms of crop addition, concluding that the percentage of addition 3-5% is enough to obtain acceptable production yields, less than 3% increases production time, more than 5% incurs crop overload with a similar yield.

With the mathematical models developed and the experimental data obtained, the continuous culture graph is obtained in which the variation of the maximum concentration at the dilution rate of 0.47 [1 / hr] is observed.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.3. OBJETIVOS	1
1.3.1. Objetivo General.....	1
1.3.2. Objetivos Específicos	2
1.4. JUSTIFICACIÓN	2
1.4.1. Justificación Técnica.....	2
1.4.2. Justificación Social	2
1.4.3. Justificación Económica	3
1.5. LÍMITES Y ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.5.1. Alcance	3
1.5.2. Limitaciones	3

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO	4
2.1. BIOREACTORES	4
2.2. QUIMIOSTATO	5
2.2.1. <i>Balance de masa en un Quimiostato</i>	6
2.2.2. Aplicaciones del Quimiostato	8
2.3. CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS	9
2.3.1. Curva de crecimiento de un organismo	9
2.3.2. Ecuación de MONOD.....	10
2.3.3. Parámetros que afectan la velocidad de crecimiento.....	11
2.3.4. Fermentación láctica	13
2.3.5. Cultivos de yogurt	14
2.3.6. Curva de crecimiento bacteriano.....	15
2.3.7. Post acidez	16
2.4. DISPOSITIVOS ELECTRÓNICOS.....	16
2.4.1. Placa de Arduino UNO	16
2.4.2. Sensores	17
2.4.2.1. Sensor de Temperatura DS18B20	18

2.4.2.2.	Sensor de FLUJO YF-S201	18	
2.4.2.3.	Sensor NIVEL Ultra-Sónico HC-SR04	19	
2.4.2.4.	Sensor pH-METRO	20	
2.4.2.5.	Turbidímetro.....	20	
2.4.3.	Actuadores	21	
2.4.3.1.	Módulo RELAY	21	
2.5.	Lactómetro	22	
CAPÍTULO 3			
CONSTRUCCIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL PROTOTIPO			23
3.1.	DISEÑO DEL QUIMIOSTATO	23	
3.2.	CONSTRUCCIÓN DEL QUIMIOSTATO	24	
3.2.1.	Materiales y equipos de trabajo.....	24	
3.2.2.	Consideraciones para el diseño del Reactor	25	
3.2.3.	Instalación del tanque de fermentación	26	
3.2.4.	Instalación del agitador	30	
3.2.5.	Instalación del tanque de alimentación.....	33	
3.2.6.	Estructura de soporte.....	34	
3.2.7.	Instalación de los micro-controladores	35	
3.2.	MICRO-CONTROLADORES.....	36	
3.3.1.	Características técnicas de un sensor.....	36	
3.3.1.1.	Calibración del sensor de Temperatura DS18B20.....	41	
3.3.1.2.	Calibración del sensor de Nivel	42	
3.3.1.3.	Calibración del sensor de Flujo	43	
3.3.1.4.	Calibración del sensor de Turbidez	44	
3.3.1.5.	Calibración del sensor de pH	46	
3.3.2.	Sistema Quimiostato	47	
CAPITULO 4			
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL			49
4.1.	PUESTA EN MARCHA Y PRUEBA EN BLANCO	49	
4.2.	CONDICIONES ASÉPTICAS PARA EL ARRANQUE DEL PROCESO	49	
4.3.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL CON CULTIVO SACHAROMYCES	51	
4.4.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL CON CULTIVO STREPTOCOCCUS THERMOFILUS Y LACTOBACILOS BULGARICOS.....	52	
4.4.1.	Materiales, insumos y equipos.....	52	

4.4.2. Preparación del medio de cultivo.....	52
4.3.3. Preparación de Cultivo Madre	54
CAPITULO 5	
CÁLCULOS Y RESULTADOS OBTENIDOS	56
5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	56
5.1.1. Procedimiento experimental	56
5.1.2. Resultados Obtenidos.....	58
5.2. Obtención de coeficientes cinéticos del proceso	62
5.3. Desarrollo del Sistema Batch	67
5.4. Desarrollo del Sistema Feed Batch.....	70
5.5. Desarrollo del Sistema Continuo.....	72
5.6. Modelos matemáticos a partir de los datos experimentales	73
5.7. Representación gráfica de los modelos matemáticos y los datos experimentales.....	75
CAPITULO 6	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	77
6.1. CONCLUSIÓN GENERAL.....	77
6.2. RECOMENDACIONES	79
BIBLIOGRAFIA.....	80
ANEXOS.....	10

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°2-1: Características de la Placa de Arduino UNO	17
Tabla N° 2-2: Características del sensor de temperatura DS18B20	18
Tabla N° 2-3: Características del sensor de flujo YF-S201	19
Tabla N° 2-4: Características del Sensor NIVEL ultra-sónico HC-SR04	19
Tabla N° 2-5: Características del Sensor de pH-METRO	20
Tabla N° 2-6: Características del Sensor turbidímetro	21
Tabla N° 2-7: Características del Módulo RELAY	21
Tabla N° 2-8: Características del Lactómetro	22
Tabla N°3-1: Lista de materiales para la construcción del quimiostato	24
Tabla N°3-2. Lista de instrumentos electrónicos del Quimiostato	24
Tabla N°3-3. Herramienta de medición.....	25
Tabla N°5-1: Producción de biomasa y consumo de sustrato.....	63
Tabla N°5-2: Cálculos realizados para la obtención de coeficientes cinéticos.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 2-1. Esquema de un biorreactor	4
Figura N° 2-2: Esquema básico de un Quimiostato	5
Figura N° 2-3. Modos de operación de los quimiostatos.....	7
Figura N° 2-4: Curva que describe el crecimiento de un microorganismo.....	9
Figura N° 2-5: Efecto de la concentración sustrato sobre la velocidad de crecimiento .	11
Figura N°2-6: Formación del ácido láctico	14
Figura N°2-7: Curva de crecimiento bacteriano	15

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica N°3-1: Relación entre el Número de Reynolds y Número de Potencia	26
Gráfica N°3-2: Calibración sensor de nivel	42
Gráfica N°3-3: Calibración sensor de flujo.....	43
Gráfica N°3-4: Tiempo vs % Inoculo, temperatura.....	45
Gráfica N°3-5: Concentración vs Voltaje	45
Gráfica N°3-6: Calibración sensor pH.....	47
Gráfica N°5-1: Tiempo vs % Inoculo Añadido a 43.5 °C	59
Gráfica N°5-2: Tiempo vs % Inoculo Añadido a 41.0 °C	60
Gráfica N°5-3: Tiempo vs % Inoculo Añadido a 39.0 °C	60
Gráfica N°5-4: Tiempo vs % Inoculo Añadido.....	61
Gráfica N°5-5: Tiempo vs % Inoculo, temperatura.....	61
Gráfica N°5-6: Tiempo vs temperatura, % inóculo	62
Gráfica N°5-7. Concentración Biomasa - Sustrato vs tiempo.....	64
Gráfica N°5-8: 1/u vs 1/S.....	66
Gráfica N°5-9: S/u vs S	66
Gráfica N°5-10: Ln B vs Tiempo.....	67
Gráfica N°5-11. Biomasa-Sustrato vs Tiempo	75
Gráfica N°5-12. Biomasa-Sustrato vs Dilución	75

CAPÍTULO 1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

1.1. ANTECEDENTES

El Quimiostato es un biorreactor diseñado para el estudio de microorganismos a través de un sistema de cultivo continuo, definido como un sistema abierto de flujo que se compone de una cámara de cultivo de volumen constante a la que llega un suministro de nutrientes y de la que se eliminan o separan los productos a través de un rebosadero. Cuando el sistema alcanza el equilibrio, el número de células y la concentración de nutrientes en la cámara permanecen constantes y entonces se dice que el sistema está en estado estacionario con las células creciendo exponencialmente.

Esta herramienta posibilita el estudio de la fisiología microbiana para aprovechar las propiedades características de los microorganismos en la planificación del crecimiento microbiano. Es utilizada como una alternativa de fermentación industrial porque se puede lograr altos niveles de productividad, los parámetros a controlar son: la concentración, temperatura, dilución, nivel, pH, aireación, entre los más importantes.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Quimiostato como cualquier otro biorreactor, requiere ser monitoreado constantemente por medio de las diferentes variables de operación que intervienen en su proceso para un mejor control, la adquisición de datos inmediatos para cada parámetro resulta complicado, para subsanar este problema, se pretende hacer uso de componentes electrónicos que están específicamente diseñados para aplicarlos en el control de los procesos, ya que tienen la capacidad de transmitir en intervalos pequeños de tiempo, los datos en los que una variable se va modificando conforme transcurre el tiempo.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

Elaborar y validar modelos matemáticos de un cultivo continuo para la producción de biomasa a través de la construcción de un prototipo de Quimiostato y la adquisición de datos del proceso con el uso de micro-controladores conectados al sistema.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Identificar los transmisores, actuadores, componentes eléctricos y materiales requeridos que se encuentran presentes en los Quimiostatos reales para poder asemejar el prototipo a desarrollar.
- Construir y evaluar el funcionamiento del Quimiostato a través de los datos obtenidos por los micro-controladores mediante una prueba en blanco (flujo de agua pura) para su aplicación al proceso elegido.
- Desarrollar modelos matemáticos de la producción de biomasa dentro del Quimiostato en Sistemas: Batch, Batch-Alimentado y Cultivo continuo, para conocer el comportamiento dinámico de la fisiología microbiana a través de los datos obtenidos por los micro-controladores instalados.
- Desarrollar un diseño experimental para corroborar los parámetros ya establecidos del crecimiento del microorganismo y poder validar el funcionamiento del prototipo elaborado.
- Elaborar la gráfica de cultivo continuo, para observar la variación de la concentración de biomasa, sustrato a diferentes diluciones y poder determinar la tasa de dilución crítica para el sistema.

1.4. JUSTIFICACIÓN

El presente proyecto se justifica a partir de los siguientes aspectos:

1.4.1. Justificación Técnica

Un Quimiostato conlleva a tres etapas de estudio: proceso batch, proceso batch-alimentado y proceso de cultivo continuo. El proyecto tiene como finalidad servir de ejemplo para desarrollar físicamente procesos químicos con sus respectivos análisis que validen la metodología usada.

1.4.2. Justificación Social

Este proyecto busca desarrollar un documento de información teórica-práctica básica y actualizada referente a la construcción de prototipos de simulación, dirigido aquellas personas que deseen incursionar en el ámbito del diseño, construcción y puesta en marcha de equipos a pequeña escala, diseñados para un cierto propósito.

“No es lo mismo ser un excelente operador de un simulador comercial (conocer todas las opciones disponibles, cómo ingresar en forma rápida los datos, cómo imprimir resultados, etc.) que conocer experimentalmente cómo reaccionará el sistema simulado ante diferentes perturbaciones de forma real”.

1.4.3. Justificación Económica

El Quimiostato es un equipo usado para el estudio de microorganismos a través de diversos experimentos, actualmente tienen un costo que oscila entre 8.000.00 \$us para un volumen de operación de 1-2 litros, a través de este proyecto buscamos construir un prototipo de Quimiostato con un costo moderadamente accesible a través de materiales de uso estándar y componentes electrónicos provistos de la Plataforma ARDUINO.

1.5. LÍMITES Y ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN

1.5.1. Alcance

El desarrollo del proyecto permitirá la obtención de un documento informativo para el análisis-estudio de un cultivo continuo para la producción de biomasa y su monitoreo a través del uso de micro-controladores mediante la construcción de un Quimiostato a escala laboratorio. Las etapas posteriores del cultivo continuo del microorganismo (secado, filtrado, enfriamiento, compresión, saborizado u otros) quedan fuera de este proyecto ya que su análisis y desarrollo de esas etapas quedan muy aparte del funcionamiento del Quimiostato.

1.5.2. Limitaciones

El prototipo a construir trata de enfocar el uso de sensores y actuadores, que permitan controlar las variables de un sistema (nivel, temperatura, pH, caudal, etc.) y la adquisición de datos de las variables de estudio. De requerirse que una variable se mantenga constante, se aplicará un sistema de control on-off, y no así un control proporcional debido a la escala laboratorio del proyecto.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

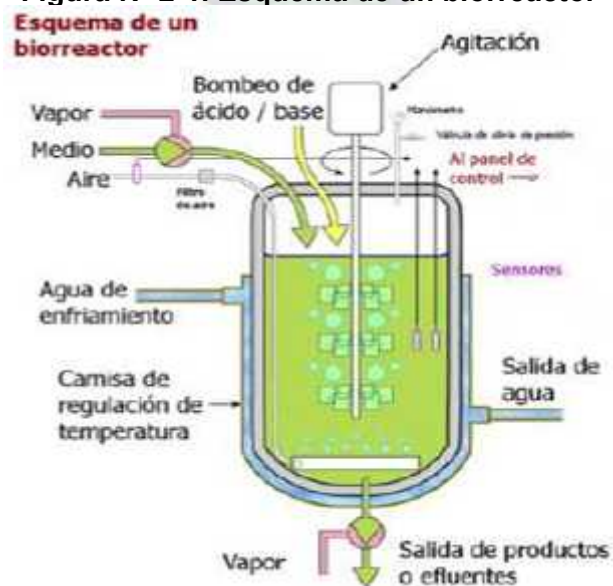
2.1. BIOREACTORES

Un biorreactor es un dispositivo biotecnológico que debe proveer internamente un ambiente controlado que garantice y maximice la producción y el crecimiento de un cultivo vivo; esa es la parte biológica. Externamente el biorreactor es la frontera que protege ese 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; esa es la parte tecnológica. [1]

El desempeño de los biorreactores depende casi en su totalidad del microorganismo que se selecciona para obtener el producto de interés. Aunque la productividad del proceso está relacionada con la optimización de los parámetros de operación del equipo. Debido a que la producción depende de la población de microorganismos el ambiente donde las células se cultivan debe proporcionar lo necesario para que ellas rindan los resultados esperados.

Antes de diseñar un biorreactor, hay que entender que la cinética del microorganismo no está determinada exclusivamente por la velocidad de reacción y las variables que la determinan. La cinética biológica igualmente depende de características intrínsecas del organismo tales como crecimiento y tasa de división celular, y también del tipo de operación que se lleve a cabo. [2]

Figura N° 2-1. Esquema de un biorreactor



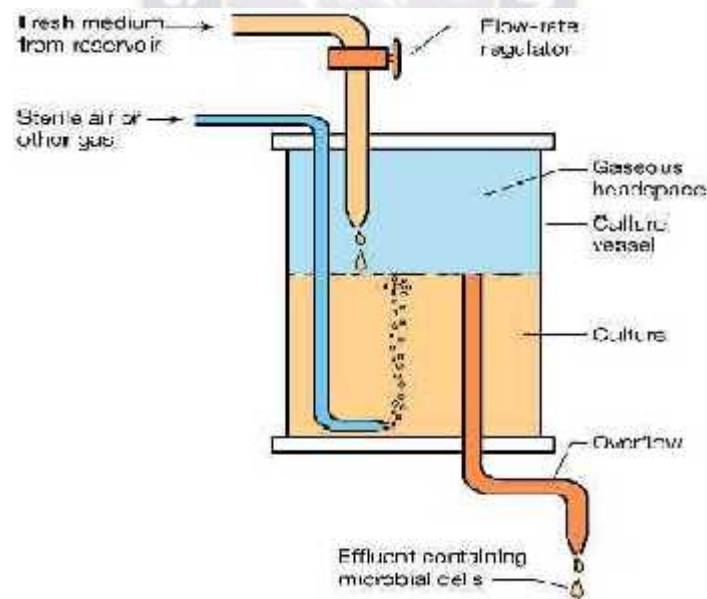
Fuente: Scragg A. Biotecnología para Ingenieros

2.2. QUIMIOSTATO

Un Quimiostato es un biorreactor que proporciona un ambiente biológicamente activo y controlado que permite el crecimiento eficaz de las células y la formación de un producto; el medio ambiente adecuado, tiene niveles óptimos de parámetros específicos como: temperatura, pH, sustratos, sales y oxígeno disuelto; este proceso puede ser aerobio o anaerobio. Este tipo de equipos frecuentemente son de forma cilíndrica, con variaciones de tamaño y fabricados normalmente en acero inoxidable. [1]

Los microorganismos dentro del Quimiostato crecen a un ritmo constante en la medida en que el suministro de nutrientes permanece coherente. Manipulando el flujo de nutrientes, es posible cambiar las tasas de crecimiento. Finalmente se llega a una tasa de crecimiento máximo, más allá del cual no se pueden ir los microorganismos. La alteración de la tasa de crecimiento puede utilizarse para controlar la velocidad en que se producen los organismos, que puede ser útil cuando las personas están produciendo microorganismos como las bacterias y levaduras en cantidades controladas para propósitos específicos. [3]

Figura N° 2-2: Esquema básico de un Quimiostato



Fuente: Shuichi Aiba. Biochemical Engineering

En el Quimiostato se puede controlar de modo independiente la densidad de la población celular y la velocidad de crecimiento del cultivo. La densidad celular en el equilibrio se controla ajustando el factor de dilución (D), mientras que la velocidad de crecimiento se controla variando la concentración del nutriente limitante en la cámara reservorio. [4]

- Los microorganismos pueden cultivarse a una amplia variedad de tasas de crecimiento exponencial.
- El Quimiostato permite crecimientos balanceados restringidos debido a que existe un nutriente o sustrato presente en una concentración suficientemente baja como para limitar la densidad de población.
- También permite elegir la densidad de células a la que se quiere trabajar

La operación en un Quimiostato puede ser de tres modos diferentes, dependiendo de los flujos de entrada y salida o la necesidad del estudio: [3]

⇒ **Cultivo Batch**

Se caracteriza por ser un sistema cerrado ya que no se añade ni se retira medio de cultivo y el microorganismo crece a partir de una limitada cantidad de nutrientes hasta que se agota un componente esencial o se acumulan subproductos tóxicos hasta niveles que gradualmente inhiben el crecimiento.

⇒ **Cultivo Feed-Batch**

Este sistema se caracteriza porque los nutrientes se adicionan intermitentemente durante la fase de producción, esta técnica es efectiva particularmente en procesos en los cuales hay inhibición por sustrato, represión catabólica e inhibición por productos.

⇒ **Cultivo Continuo**

Se caracteriza por ser un sistema abierto que mantiene las células en un estado de crecimiento equilibrado añadiendo continuamente medio fresco y retirando el medio de cultivo a la misma velocidad, siendo necesario alcanzar y mantener un flujo de sustrato permanente y constante hasta alcanzar un estado estable donde la velocidad de dilución se iguala a la velocidad específica de crecimiento.

2.2.1. Balance de masa en un Quimiostato

El modelo matemático general del proceso es obtenido mediante el balance de materia en el Quimiostato, una forma general de este concepto es la ley de conservación de la masa.

$$\text{Flujo másico de acumulación} = \text{Flujo másico de ingreso} - \text{Flujo másico de salida} + \text{Flujo másico de formación} - \text{Flujo másico de consumo}$$

Su representación matemática es la siguiente:

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F_1 C_{i1} - F_2 C_i + V r_{i1} - V r_c$$

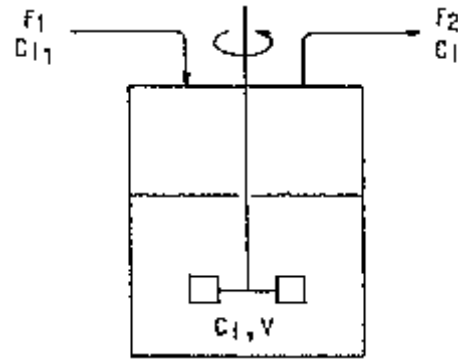
Donde:

V = Volumen de cultivo.

F_1, F_2 = Flujo de entrada y de salida.

C_{i1}, C_{i2} = Concentración de entrada y salida.

r_{i1} y r_{i2} = Velocidad de formación y consumo del componente "i".



⇒ **Modo Discontinuo o en Batch**

Ambos caudales son nulos por lo que V es constante, en la ecuación general se anulan los términos de flujo. La duración del cultivo Batch es limitada en el tiempo y depende esencialmente de las condiciones iniciales del cultivo. Una vez inoculado el medio la concentración de biomasa aumenta a expensas de los nutrientes y cuando el sustrato que limita el crecimiento se agota, finaliza el Batch.

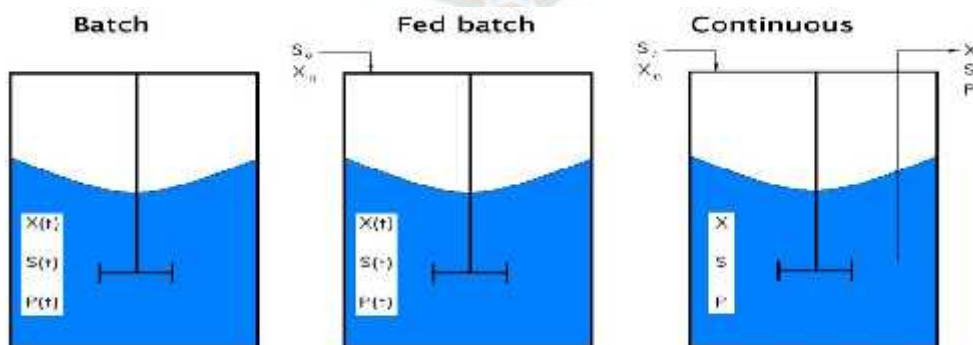
⇒ **Modo Feed - Batch**

El caudal de salida es nulo, por lo que V aumentará en el tiempo en función del caudal de entrada, debe destacarse que en este caso que V varia con el tiempo. Por tal motivo el Batch alimentado tiene duración limitada en el tiempo ya que el volumen no puede incrementarse más allá del volumen útil que posee el biorreactor.

⇒ **Modo Cultivo Continuo**

Inicia al culminar el proceso Feed Batch, ambos caudales de ingreso y salida son iguales por lo tanto el volumen V es constante, la variación del proceso está en función del flujo de sustrato de ingreso.

Figura N° 2-3. Modos de operación de los quimiostatos



Fuente: Scragg A. Biotecnología para Ingenieros

2.2.2. Aplicaciones del Quimiostato

Los Quimiostatos han encontrado aplicación en una gran variedad de procedimientos de investigación, especialmente en los casos en que se desea que las poblaciones naturales a menudo crecen lentamente o a concentraciones bajas de nutriente, los Quimiostatos han sido especialmente útiles como modelos de laboratorio de ecosistemas microbianos naturales. [9]

Las aplicaciones del Quimiostato se pueden resumir en los siguientes puntos:

- 1) *Producción de biomasa*: La producción de biomasa es la base de la producción de proteína microbiana.
- 2) *Transformación de sustratos*: fermentación de metabolitos secundarios e intermediarios.
- 3) *Producción de enzimas*: La actividad enzimática de los microorganismos dependen grandemente del crecimiento y del tipo de sustrato limitante. Para controlar completamente estas condiciones se hace necesario el empleo del Quimiostato.
- 4) *Producción de vacunas*: El Quimiostato puede usarse para elucidar los efectos del medio sobre la producción de antígenos, y por consiguiente sobre la calidad de las vacunas.
- 5) *Cultivo de células de tejidos*: Tanto células animales, como vegetales, pueden ser cultivadas en el Quimiostato.
- 6) *Producción de cerveza y vino*: El uso del Quimiostato con recirculación es ventajoso para la fabricación continua de cerveza y vino, ya que así se aumenta la producción.
- 7) *Fermentaciones de la leche*: Cultivos de Quimiostato pueden ser usados para la producción de "iniciadores" para la fabricación de quesos y leches fermentadas, tal como el yogurt.
- 8) *Purificación de efluentes*: El Quimiostato con recirculación puede utilizarse en el estudio de la microbiología de la purificación de efluentes y de la dinámica de los procesos que tienen lugar.
- 9) *Ecología y contaminación*: En muchos ambientes naturales (ríos, lagos, mares, suelo) el crecimiento de los microorganismos está limitado por el suministro de nutrientes. La simulación de estos ambientes para efectuar estudios ecológicos se puede realizar en el Quimiostato.

El Quimiostato es ventajoso para estudiar los procesos que tienen lugar durante la fermentación ruminal.

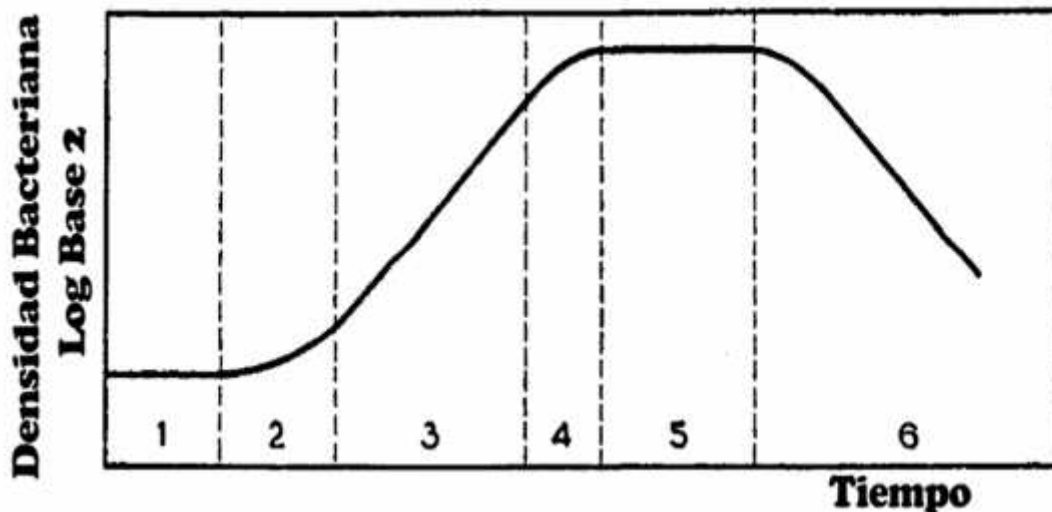
2.3. CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

2.3.1. Curva de crecimiento de un organismo

Esta curva se planteó para representar el comportamiento del crecimiento de microorganismos a través del tiempo. Con base en ella, se determina cuándo se produce la mayor cantidad de biomasa o de metabolitos (primarios o secundarios).

La siguiente figura muestra las diferentes fases de crecimiento de un microorganismo. [5]

Figura N° 2-4: Curva que describe el crecimiento de un microorganismo



Fuente: Scragg A. Biotecnología para Ingenieros

Fases de crecimiento:

- 1-Lag (latencia)
- 2-Aceleración
- 3-Exponencial
- 4-Desaceleración
- 5-Estacionaria
- 6-Decadencia

Fase de latencia: Esta fase se sitúa inmediatamente después de la inoculación del microorganismo o cepa en el medio. Durante esta primera etapa, el microorganismo se adapta a su nuevo medio, se reorganiza y sintetiza nuevas enzimas.

Este tiempo de adaptación puede variar en función del estado fisiológico del microorganismo y de factores físico-químicos tales como la temperatura, el pH, el oxígeno. De igual manera los nutrientes y los substratos presentes en el medio pueden inducir la represión de actividades metabólicas. Es posible reducir y aún de suprimir la fase de latencia por la inoculación de una población "pre-adaptada" habiendo sido objeto de un pre-cultivo en las mismas condiciones de crecimiento.

Fase de aceleración: La fase de aceleración comienza desde la adaptación efectiva de las células a sus nuevas condiciones de cultivo. Durante este periodo, el valor de μ aumenta hasta alcanzar su valor máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$).

Fase de crecimiento exponencial: Esta fase se caracteriza por una multiplicación exponencial de la población microbiana. Las células se encuentran en un estado fisiológico óptimo y la tasa de crecimiento μ se mantiene en su valor máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$).

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m \cdot x$$

Fase de desaceleración: Durante la fase de desaceleración, el valor de μ disminuye hasta hacerse nulo. Esta reducción de la velocidad de crecimiento puede deberse a un agotamiento de ciertos elementos nutritivos del medio o provocada por la acumulación en el curso del cultivo de productos metabólicos tóxicos para el microorganismo.

Fase estacionaria: Durante toda la fase estacionaria, la concentración de biomasa permanece constante ($x = cte$). La velocidad específica de crecimiento es por lo tanto nula ($\mu = 0$). Este estado global del cultivo puede ser explicado por una interrupción de la duplicación celular o por un equilibrio entre la velocidad de crecimiento ($\frac{d}{dt}$) y la velocidad de mortalidad.

Fase de decadencia: La decadencia corresponde a una disminución de la población microbiana, se trata de la última etapa del proceso. Esta pérdida de biomasa es causada por una carencia energética (agotamiento de las reservas) o por una intoxicación por productos metabólicos.

2.3.2. Ecuación de MONOD

Monod fue el primero en investigar el efecto de la concentración, encontrando que el ciclo de crecimiento procedía cuando se inoculaba medio nuevo con glucosa como única fuente de carbono y energía, con todos los otros nutrientes en exceso, μ es constante durante la fase exponencial, luego tiende a cero en la fase de desaceleración, donde la concentración del sustrato se reduce. [6]

La relación entre la velocidad específica del crecimiento μ , y la concentración de sustrato **S** es una hipérbola. Monod propuso una expresión para describir esta curva:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$$

Donde:

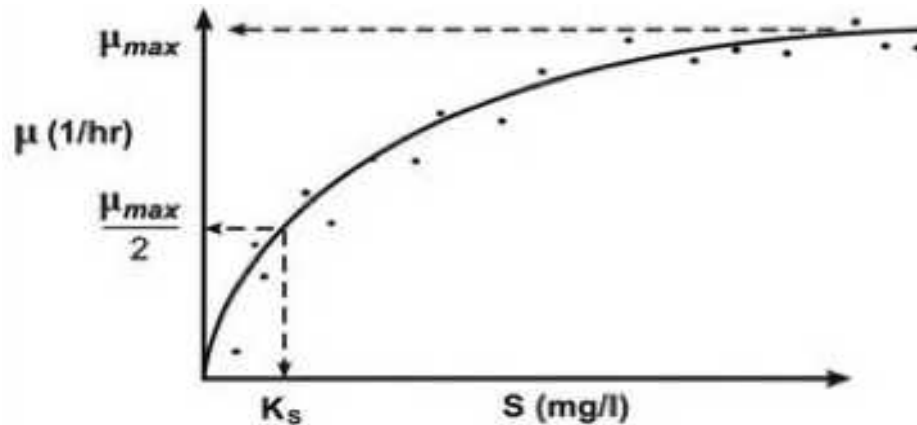
μ = velocidad específica de crecimiento, [h^{-1}]

S = concentración de sustrato limitante, [g/l]

μ_m = velocidad específica de crecimiento máximo

K_s = constante de saturación o constante de Monod, [g/l]

Figura N° 2-5: Efecto de la concentración sustrato sobre la velocidad de crecimiento



Fuente: Koga S. and Humphrey, A. E., Biotecnol. Bioeng

Durante la fase de crecimiento exponencial $S > K_s$ y en consecuencia $\mu = \mu_m$, es decir, en el cultivo intermitente la población crece a la máxima velocidad posible. K_s representa la afinidad de los organismos por el sustrato. En general los valores de K_s son extremadamente bajas y difíciles de determinar usando las técnicas de cultivo por lote.

2.3.3. Parámetros que afectan la velocidad de crecimiento

Efecto de la temperatura

La temperatura es un factor relevante en los procesos de producción de biomasa, debido a que desde el punto de vista microbiológico los microorganismos presentan temperaturas óptimas para su crecimiento donde se obtiene el mayor rendimiento. Esta temperatura suele encontrarse muy cerca de la temperatura máxima soportada y varía según la clase de microorganismo. [8]

Como en todas las reacciones químicas, el crecimiento microbiano es afectado por la temperatura, el crecimiento se describe por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \alpha X$$

Donde:

μ = velocidad específica de crecimiento, [h^{-1}]

α = velocidad específica de muerte, [h^{-1}]

El crecimiento observado es un balance entre el crecimiento y la mortalidad, sin embargo las condiciones son tales que $\mu \gg \alpha$, el valor de α normalmente es insignificante.

Los microorganismos están divididos en tres clases según la temperatura óptima para su crecimiento, son los psicrófilos ($< 20^\circ\text{C}$), mesófilos ($20 - 37^\circ\text{C}$) y termófilos ($>38^\circ\text{C}$).

La producción de biomasa decae a temperaturas extremas, por desnaturalización térmica de las proteínas a temperaturas altas y por alteraciones en los mecanismos de transporte de la célula, como el transporte de sustratos a temperaturas bajas.

Efecto del pH

El pH es una variable significativa en la producción de biomasa, cada microorganismo presenta un rango de pH donde su crecimiento es posible e incluso algunos presentan un pH óptimo, puesto que cambios en el pH son causantes de la desnaturalización de enzimas y de problemas en el intercambio de iones en la membrana celular. [9]

Tiene además influencia en la inhibición por pH debido al efecto que esta variable tiene sobre los centros activos de las enzimas, en la variación en las proporciones de los constituyentes del producto final de una fermentación, en el conjunto de las floculaciones coloidales y en las características organolépticas del medio de cultivo. El pH varía durante el crecimiento a causa de las reacciones metabólicas que se llevan a cabo, consumiendo o produciendo sustancias ácidas o básicas que acidifican o basifican el medio.

Efecto de la aireación y agitación

La actividad celular, la secreción de enzimas y la velocidad de fermentación al inicio del proceso, dependen estrechamente de las condiciones de aireación, por lo tanto, es conveniente airear el medio hasta el máximo. Aunque este proceso se dificulta por la poca solubilidad del gas en el medio de cultivo (líquido), este inconveniente puede superarse en parte si se logra una agitación adecuada dentro del fermentador. [9]

Generalmente la aireación del medio se realiza mediante el suministro de oxígeno (gas), el cual constituye un factor determinante para lograr un alto rendimiento en el crecimiento de

los microorganismos aeróbicos, debido a que cuando el suplemento de aire se reduce, el microorganismo, deja o suprime casi completamente su multiplicación.

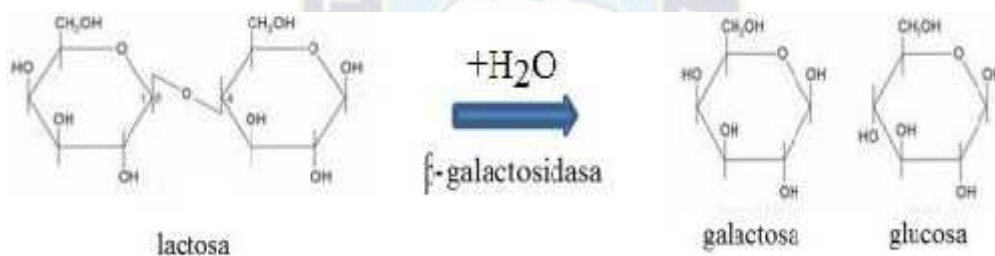
2.3.4. Fermentación láctica

La fermentación es una reacción química llevada a cabo por microorganismos (bacterias), y fue el científico Louis Pasteur quien asoció este proceso de degradación en algunos alimentos como parte de la acción bacteriana.

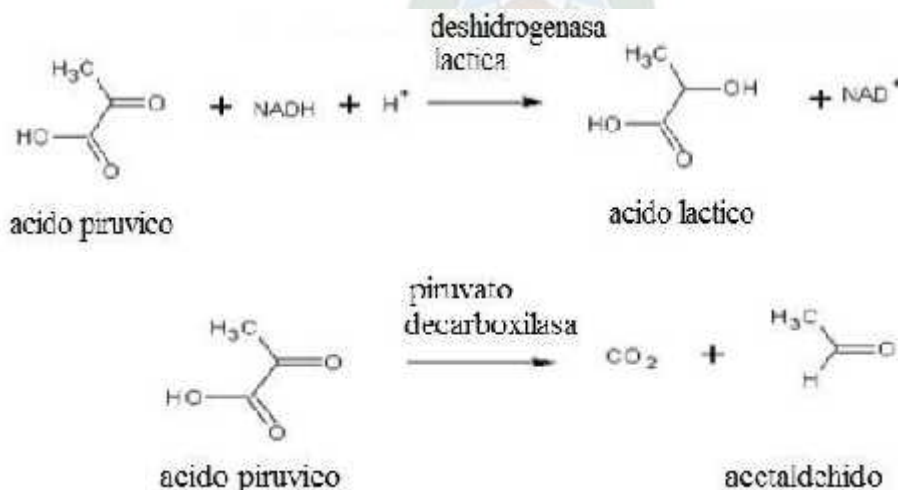
La fermentación láctica es un proceso metabólico que realizan ciertas bacterias y hongos esto ocurre gracias a que los microorganismos toman la glucosa presente en algunos alimentos y la transforman en ácidos y dióxido de carbono.

Bioquímica de la fermentación

La composición química del yogurt cambia según el tipo de leche y según la adición de sustancias aromatizantes o de fruta. Los ingredientes y el modo de elaboración determinan los tipos de yogurt: líquidos, cremosos, desnatados, con frutas, etcétera.



De la lactosa se obtiene la galactosa y glucosa, este último es el sustrato inicial para la fermentación. La glucosa forma el piruvato que posteriormente puede ser transformado en ácido láctico por la enzima deshidrogenasa láctica y en acetaldehído por una serie de enzimas entre las cuales se encuentra la piruvato decarboxilasa.



2.3.5. Cultivos de yogurt

Son varias las especies de microorganismos que se pueden encontrar en el yogurt, las más importantes son:

- **Lactobacillus bulgaricus.**

Pertenecen al género de bacterias Gram positivas anaerobias Aero tolerantes, la mayoría de estas bacterias convierten la lactosa y los monosacáridos en ácido láctico provocando la fermentación láctica.

Los lactobacillus bulgaricus crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 – 4,5 y con un óptimo desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores menores a 4 y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Estas bacterias son capaces de disminuir el pH del sustrato a causa del ácido láctico producido. [10]

Así también fermentan la leche para producir acetaldehído provocando una bajada del pH que coagula la leche mediante la desnaturalización de sus proteínas y creando así el aroma característico de yogurt, estas bacterias crecen mejor en ambientes ácidos y son utilizadas para producir diferentes tipos de yogurt.

Figura N°2-6: Formación del ácido láctico



Fuente: Thomas – Microbiología

- **Streptococcus thermophilus**

Son capaces de fermentar la lactosa, sacarosa, glucosa y fructuosa, durante el período de incubación, los cultivos se multiplican y producen ácido láctico y otros compuestos. Es un

hecho bien conocido que *Streptococcus thermophilus* no tolera la acidez, por lo que resulta poco probable que esta especie resista el paso a través del estómago. [10]

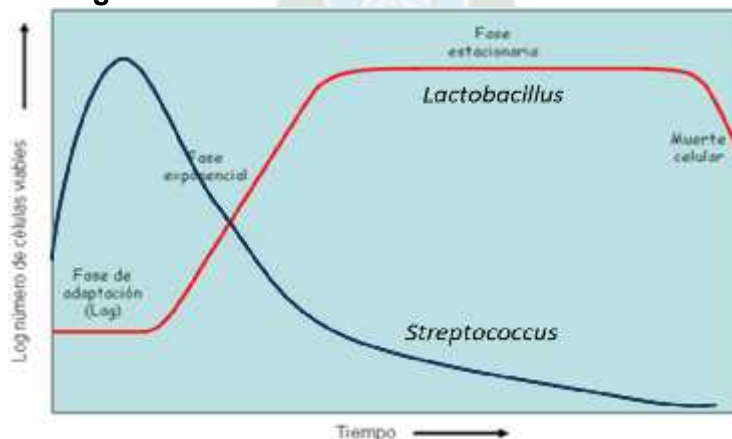
Streptococcus thermophilus, es una bacteria homo fermentativa termo resistente produce ácido láctico como principal producto de la fermentación, se desarrolla a 37-40° pero puede resistir 50° e incluso 65° media hora. Tiene menor poder de acidificación que el *Lactobacillus*.

2.3.6. Curva de crecimiento bacteriano [11]

Para la producción de yogurt se utiliza comúnmente un cultivo mixto, compuesta por *Streptococcus salivarius* subs. *Thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subs. *Bulgaricus*, puesto que estas dos bacterias trabajan en simbiosis, complementando sus factores de crecimiento y deteniendo el proceso de fermentación cuando el pH limita su desarrollo.

La producción del yogurt es un proceso metabiótico, cuando la leche pasteurizada es inoculada con los dos tipos de microorganismos y se incuba a 43°C *Streptococcus* se encuentra en condiciones óptimas, de manera que la fase de latencia es nula y pasa a la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo *Lactobacillus* no crece bien bajo estas condiciones, prefiere un pH más ácido para crecer y su fase de latencia es más larga. En el transcurso de unos 30 minutos después de la inoculación se ha alcanzado un pH en la leche de 6. Bajo estas condiciones *Streptococcus* llega a la fase estacionaria, llegando incluso al declive, pero deja un pH aproximadamente de 6. Como *Lactobacillus* tiene un pH óptimo de crecimiento de 5.5 se dispara la fase exponencial de crecimiento de éste y la producción de ácido láctico es máxima, alcanzando un pH de 4.5. A este pH *Lactobacillus* llega a la fase estacionaria (sin crecimiento neto) y la caseína de la leche ha precipitado por completo.

Figura N°2-7: Curva de crecimiento bacteriano



Fuente: Mendo R. Manuel - Medios de cultivo en microbiología

2.3.7. Post acidez

El fenómeno de la acidificación es un proceso bioquímico caracterizado por su complejidad e incluye diversas reacciones en las cuales el cultivo de fermentación produce ácido láctico y compuestos aromáticos y volátiles que dan al yogurt sus características particulares.

La acidez y bajo pH resultante de la fermentación del ácido láctico también inducen cambios estructurales significativos que son responsables de la textura del yogurt y sus características reológicas únicas. Mientras que *S. thermophilus* tolera hasta 0,8% de ácido láctico y *L. bulgaricus* hasta 1,7%, el contenido de ácido en un yogurt de acidez moderada por lo general oscila entre 0,85% - 0,95%, y en uno más ácido entre 0,95% - 1,20%.

Estos niveles se encuentran muy por debajo del rango de tolerancia de *L. bulgaricus*, principal cepa involucrada en la post-acidificación, por lo cual una vez alcanzada la acidez deseada es necesario paralizar el proceso mediante enfriamiento, a fin de reducir la actividad metabólica de los microorganismos y retener las propiedades reológicas del producto.

Sin embargo, como ingredientes bioactivos, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* pueden seguir produciendo ácido láctico incluso después del enfriamiento del producto, cuando eso sucede se produce lo que se denomina post-acidificación. Un yogurt evidencia post-acidificación cuando, tras haber llegado a un pH de corte de 4.6, las bacterias lácticas continúan replicándose, metabolizando y produciendo una lenta pero progresiva acidificación. Esto lleva a que el pH caiga a valores menores a 4.0 provocando alteraciones en el sabor (demasiado ácido) y reducción en la vida útil del producto.

2.4. DISPOSITIVOS ELECTRÓNICOS

2.4.1. Placa de Arduino UNO

Arduino es una plataforma de hardware libre, basada en una placa con micro-controladores y un entorno de desarrollo (software), diseñada para facilitar el uso de la electrónica en proyectos multidisciplinarios, siendo así una plataforma abierta que facilita la programación de un controlador.

La placa ARDUINO UNO cuenta con un circuito de soporte que incluye reguladores de tensión, un puerto USB conectado a un módulo adaptador USB-Serie que permite programar el microcontrolador desde cualquier PC. Un arduino dispone de 14 pines que pueden configurarse como entrada o salida y a los que puede conectarse cualquier dispositivo que sea capaz de transmitir o recibir señales digitales de 0 y 5 V.

Mediante las entradas analógicas podemos obtener datos de sensores en forma de variaciones continuas de un voltaje. Las salidas analógicas suelen utilizarse para enviar señales de control en forma PWM (modulación por ancho de pulsos). [12]

A continuación se presentan las siguientes características técnicas de la Placa:

Tabla N°2-1: Características de la Placa de Arduino UNO

PARÁMETROS	CONDICIONES TÉCNICAS
Microcontrolador:	Atmega 38
Voltaje de operación:	5V
Voltaje de entrada (recomendado)	7 – 12 V
Voltaje de entrada (limite)	6 -20 V
Pines para entrada – salida digital:	14 (6 pueden usarse como salda de PWM)
Pines de entrada analógica:	6
Corriente continua por pin IO:	40 mA
Corriente continua en el pin 3.3 V:	50 mA
Momería Flash:	32 KB (0,5 KB ocupados por el bootloader)
SRAM:	2 KB
EEPROM:	1 KB
Frecuencia	16 Hz



2.4.2. Sensores [13]

Un sensor es un dispositivo capaz de detectar magnitudes físicas o químicas, llamadas variables de instrumentación y transformarlas en variables eléctricas.

Las variables de instrumentación pueden ser: temperatura, presión, fuerza, humedad, pH, entre otros, mientras que una magnitud eléctrica puede ser: una resistencia eléctrica (como una RTD), una capacidad eléctrica (como un sensor de humedad o un sensor capacitivo), una tensión eléctrica (como un termopar), una corriente eléctrica (como en un fototransistor) Estos sensores permiten medir las variables ambientales del entorno para poder tomar decisiones en función de los cambios en el entorno.

2.4.2.1. Sensor de Temperatura DS18B20

El sensor presenta una buena precisión hasta los 125°C, y el cable presenta una cubierta plástica de PVC que evita la corrosión, aunque se recomienda **no exceder los 100°C** para que el cable no sufra deterioro, el sensor esta encapsulado en un tubo de acero de alta calidad a prueba de agua y corrosión.

Dado que es un sensor digital, la señal leída no se degrada debido a la distancia del cableado. Puede funcionar en modo 1-Wire con una precisión de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con una resolución de 12 bits. También pueden utilizarse varios sensores sobre el mismo pin ya que internamente viene programado con un ID único de 64 bits para diferenciarlos. [14]

A continuación se muestra las características más relevantes de este sensor.

Tabla N° 2-2: Características del sensor de temperatura DS18B20

PARÁMETROS	CONDICIONES TÉCNICAS	SENSOR DE TEMPERATURA DS18B20
Voltaje de alimentación:	3 VDC – 5.5 VDC	
Señal de salida:	Digital	
Rango de medida:	-55 °C – 125 °C	
Precisión:	$\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (de -10°C a +85°C)	
Resolución:	0.5 °C	
Rango de temperatura:	-55°C a +125°C.	
Tiempo de captura:	< 750 ms	
Resolución:	De 9 a 12 bits	
Diámetro del cable:	4 mm	
Longitud del cable:	91 cm	


2.4.2.2. Sensor de FLUJO YF-S201

El sensor de Flujo YF-S201 sirve para medir el flujo del agua, está constituido por una carcasa de plástico, un rotor de agua y un sensor de efecto Hall. El funcionamiento de este sensor es muy simple, es decir, en el rotor tiene un pequeño imán adherido para poder registrar una vuelta cada vez que pasa por el sensor magnético de efecto Hall que hay en el otro lado del tubo, generándose pulsos de salida a una velocidad proporcional a la del

flujo. En la parte posterior del sensor hay una flecha para indicar la dirección del flujo. Cada pulso en la salida del sensor equivale aproximadamente a 2,25 mililitros. [12]

A continuación se muestran las características más relevantes de este sensor.

Tabla N° 2-3: Características del sensor de flujo YF-S201

PARÁMETROS	CONDICIONES TÉCNICAS	SENSOR DE FLUJO YF-S201
Voltaje de funcionamiento:	5 V ~ 18 V	
Corriente de operación:	15 mA (5V)	
Frecuencia del caudal:	f (Hz) = 7,5 * Q (L/min)	
Pulsos por litro:	450	
Rango del Caudal:	1 L/hr ~ 30 L/hr	
Presión máxima del agua:	2,0 MPa	
Humedad de almacenamiento:	25 %C ~ 95 % RH	
Temperatura de operación:	-25 °C ~ 80 °C	
Durabilidad:	300.000 ciclos mínimo	
Conexiones:	0.78 '' de diámetro exterior y 1/2 '' de la rosca	

2.4.2.3. Sensor NIVEL Ultra-Sónico HC-SR04

Este sensor tiene el mismo funcionamiento que un radar ya que envía pulsos a alta frecuencia en este caso ultrasónicos. Está compuesto por dos piezoeléctricos: un transmisor y receptor ambos en forma de cilindro, el transmisor se encarga de emitir la señal ultrasónica para luego ser rebotada a través de un objeto llegando al cilindro receptor. Debido a que la señal tardará un tiempo en regresar desde que se emite, es obvio pensar que la velocidad con la cual llegará al receptor está íntimamente relacionada con la distancia de transmisión y rebote. [12]

A continuación se muestra las especificaciones técnicas más relevantes de este sensor:

Tabla N° 2-4: Características del Sensor NIVEL ultra-sónico HC-SR04

PARÁMETROS	CONDICIONES TÉCNICAS	SENSOR NIVEL ULTRA-SÓNICO HC-SR04
Voltaje de Operación:	5V DC	
Corriente de reposo:	< 2mA	
Corriente de trabajo:	15mA	
Rango de medición:	2cm a 450cm	
Precisión:	+ - 3mm	
Ángulo de apertura:	15°	
Frecuencia de ultrasonido:	40KHz	
Duración mínima del pulso de disparo TRIG (nivel TTL):	10 μS	

PARÁMETROS	CONDICIONES TÉCNICAS	SENSOR NIVEL ULTRA-SÓNICO HC-SR04
Duración del pulso ECO de salida (nivel TTL):	100-25000 μ S	
Dimensiones:	45mm x 20' \times 8mm x 15mm	
Tiempo mínimo de espera entre una medida y el inicio de otra 20ms (recomendable 50ms)		

2.4.2.4. Sensor pH-METRO

El pH es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. El pH indica la concentración de iones hidronio [H₃O⁺] presentes en determinadas sustancias. Este kit permite medir de forma sencilla el pH de un líquido gracias a su placa controladora que ofrece un valor analógico proporcional a la medición. El controlador tiene un potenciometro multivuelta que permite la correcta calibración de la sonda. Se debe limpiar bien la sonda en cada cambio de medición para no alterar su precisión. [14]

A continuación se muestra las características más relevantes de este sensor.

Tabla Nº 2-5: Características del Sensor de pH-METRO


PARÁMETROS	CONDICIONES TÉCNICAS	SENSOR pH-METRO
Alimentación:	5.00V	
Consumo:	5-10mA	
Rango de medición:	0-14 pH	
Temperatura de medición:	0-80 °C	
Precisión:	\pm 0.1pH (25 °C)	
Tiempo de respuesta	\leq 5s	
Sonda de pH con conector	BNC	
Controlador pH	2.0 (3 pines)	

2.4.2.5. Turbidímetro

El sensor de turbidez detecta la calidad del agua al medir el nivel de turbidez. Es capaz de detectar partículas suspendidas en el agua midiendo la transmitancia de la luz y la velocidad de dispersión que cambia con la cantidad de sólidos suspendidos totales (SST) en el agua. A medida que aumenta el SST, aumenta el nivel de turbidez del líquido. Este sensor tiene ambos modos de salida de señal analógica y digital. Puede seleccionar el modo según la MCU, ya que el umbral se puede ajustar en el modo de señal digital. [13]

A continuación se muestra las características más relevantes de este sensor.

Tabla Nº 2-6: Características del Sensor turbidímetro

PARÁMETROS	CONDICIONES TÉCNICAS	SENSOR TURBIDÍMETRO
Voltaje de funcionamiento:	5V DC	
Corriente de funcionamiento:	40mA (MAX)	
Tiempo de respuesta:	500ms	
Resistencia de aislamiento:	100M (Min)	
Método de salida:	Analógico	
Salida analógica:	0-4.5V	
Salida digital:	señal de nivel alto / bajo	
Temperatura de funcionamiento:	-30 ~ 80	
Temperatura de almacenamiento:	-10 ~ 80	
Peso:	30 g	
Dimensiones del adaptador:	38 mm * 28 mm * 10 mm	

2.4.3. Actuadores [12]

Un actuador es un dispositivo capaz de transformar energía hidráulica, neumática o eléctrica en la activación de un proceso con la finalidad de generar un efecto sobre elemento externo. Este recibe la orden de un regulador, controlador o en nuestro caso un Arduino y en función a ella genera la orden para activar un elemento final de control.

2.4.3.1. Módulo RELAY

El manejo de un módulo Releé o Relay nos permite controlar el encendido y apagado de cualquier aparato que se conecte a una fuente de alimentación eléctrica externa. El releé hace de interruptor y se activa y desactiva mediante una entrada de datos, gracias a esto podemos controlar el encendido de cualquier aparato. [13]

Tabla Nº 2-7: Características del Módulo RELAY


PARÁMETROS	CONDICIONES TÉCNICAS	MÓDULO RELAY
Voltaje de Operación:	5V DC	
Señal de Control:	TTL (3.3V o 5V)	
Nº de Relays (canales)	2 CH	
Modelo Relay	SRD-05VDC-SL-C	
Capacidad máxima	10A/250VAC, 10A/30VDC	
Corriente máxima	10A (NO), 5A (NC)	
Tiempo de acción	10 ms / 5 ms	
Para activar salida NO	0 Voltios	
Entradas Optoacopladas	Entradas Optoacopladas	
Indicadores LED de activación	Indicadores LED de activación	

2.5. Lactómetro

Un lactómetro es una herramienta muy importante en el control de leche que nos permite ver el porcentaje de sólidos no grasos en la leche, es muy diferente al lactodensímetro que es un instrumento de medida muy simple que es utilizado en la comprobación de la densidad de la leche. [14]

La densidad de la leche varia de manera considerable con el contenido graso y de sólidos que están presentes en la emulsión y suele estar oscilando entre un peso específico de 1,028 a 1,034.

Tabla Nº 2-8: Características del Lactómetro

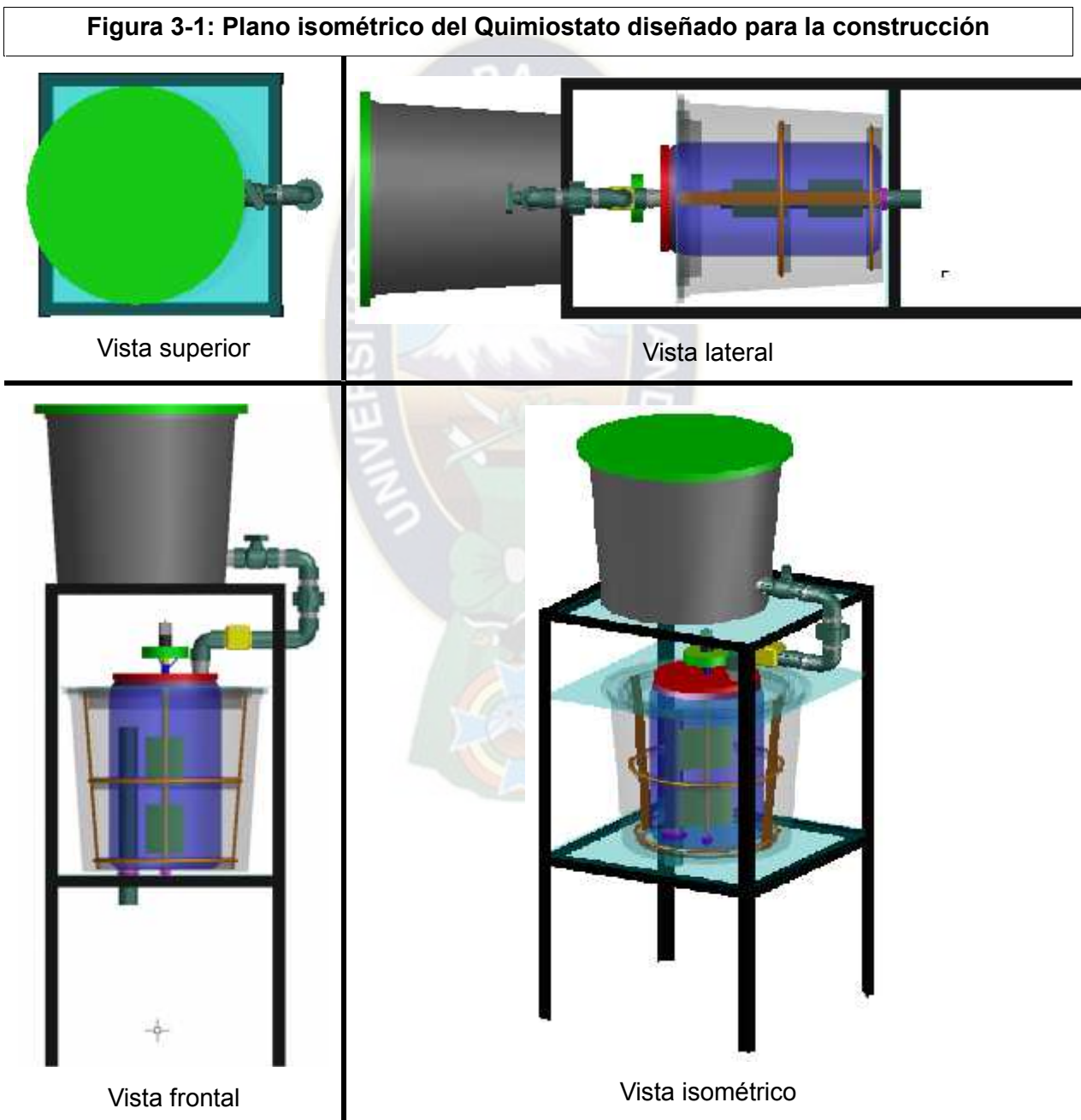
PARÁMETROS	CONDICIONES TÉCNICAS	LACTÓMETRO
Rango de medición:	0-90% Brix	
División de la subasta:	0.5% Brix	
Temperatura de referencia:	20 Centígrados	
Calibración manual con conductor mini-tornillo incluido		

CAPÍTULO 3

CONSTRUCCIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL PROTOTIPO

La construcción del prototipo será realizado con material plástico y no acero inoxidable con la finalidad de no incurrir en altos costos del proyecto de modo que el proyecto sea alcanzable por diferentes personas que deseen incursionar en la construcción de prototipos.

3.1. DISEÑO DEL QUIMIOSTATO



Fuente: Elaboración propia, 2019

3.2. CONSTRUCCIÓN DEL QUIMIOSTATO

3.2.1. Materiales y equipos de trabajo

Para la construcción y operatividad del quimiostato se utilizaron los siguientes materiales:

Tabla N°3-1: Lista de materiales para la construcción del quimiostato

N°	ITEM	CANTIDAD (unidad)	N°	ITEM	CANTIDAD (unidad)
1	Balde de 20 L	2	13	Unión universal (niple) ½ plg	1
2	Balde de 15 L	1	14	Válvula globo ½ plg	1
3	Botella de 7 L	1	15	Unión simple externa ½ plg	6
4	Recipiente con tapa igual al diámetro de la botella	1	16	Unión simple interna ½ plg	1
5	Barras de plástico 2x35 cm	2	17	Unión simple interna ½ plg con rosca de sujeción	1
6	Resistencia de hornilla de 10 K	1	18	Tubería de ½ plg 20 cm	1
7	Tubo de plástico con su eje ¼ plg	1	19	Teflón ½ plg	2
8	Abrazadera de ¼ plg	1	20	Goma de Dint ½ plg (para tubería)	2
9	Placas de plástico de 8x8 cm	2	21	Goma de Dext ½ plg (para perno)	2
10	Placas de plástico de 35x35 cm	1	22	Perno de 5/8 x 1.5 plg galvanizado	1
11	Placa de madera de 35x35 cm	2	23	Perno de 5/8 x 1.0 plg	24
12	Codo de ½ plg	3	24	Barra angular metálica ¾ plg x 6 m	1

Fuente: Elaboración propia, 2019

Tabla N°3-2. Lista de instrumentos electrónicos del Quimiostato

N°	ITEM	CANTIDAD (unidad)	N°	ITEM	CANTIDAD (unidad)
1	Placa Arduino UNO	1	5	Moto reductor de 12 V	1
2	Sensor de Temperatura DS18B20	1	6	Sensor pH-metro	1
3	Sensor de flujo YF-S201	1	7	Sensor Turbidímetro	1
4	Sensor nivel Ultra-Sónico HC-SR04	1	8	Actuador Módulo Relay	1

Tabla N°3-3. Herramienta de medición

N°	ITEM	CANTIDAD (unidad)
1	Lactómetro	1

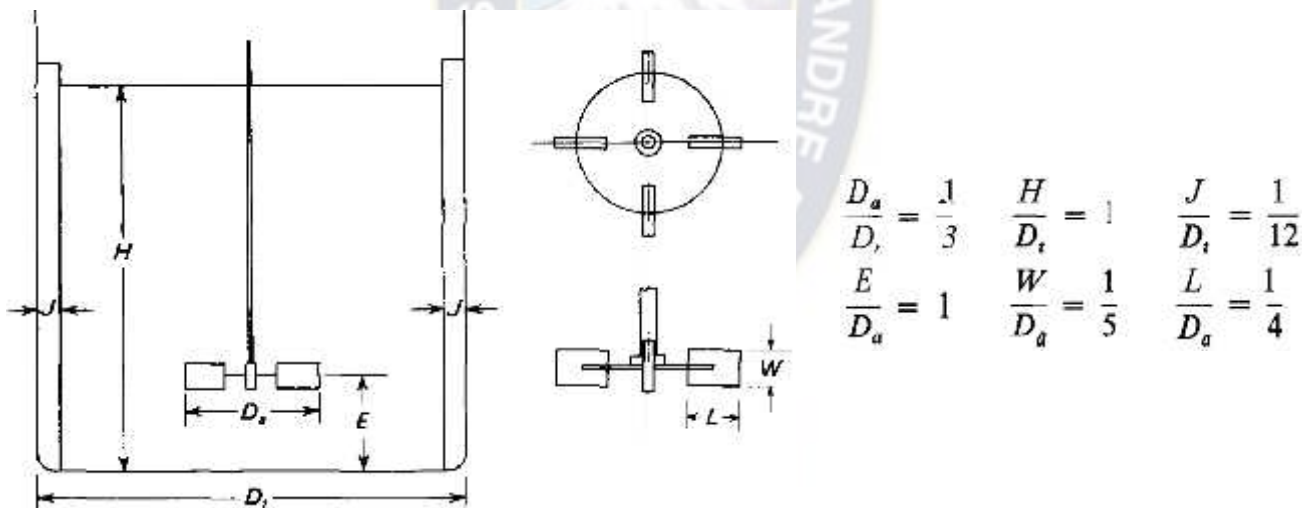
Fuente: Elaboración propia, 2019

3.2.2. Consideraciones para el diseño del Reactor

Los líquidos son agitados con mayor frecuencia en tanques o recipientes, generalmente de forma cilíndrica y provista de un eje vertical soportado en la parte superior. El eje está accionado por un motor, a veces directamente conectado al eje, pero más frecuentemente acoplado al eje a través de una caja reductora de velocidad.

Para Diseñar un tanque agitado existen varias elecciones sobre los tipos y localización del agitador, las proporciones del tanque, el número y dimensión de las placas deflectoras etc. Como punto de partida se utilizó las siguientes proporciones:

Imagen N°3-1: Características de un reactor



Fuente: Operaciones Unitarias en Ingeniería Química - Warren L. McCabe - J. C. Smith - P. Harriot

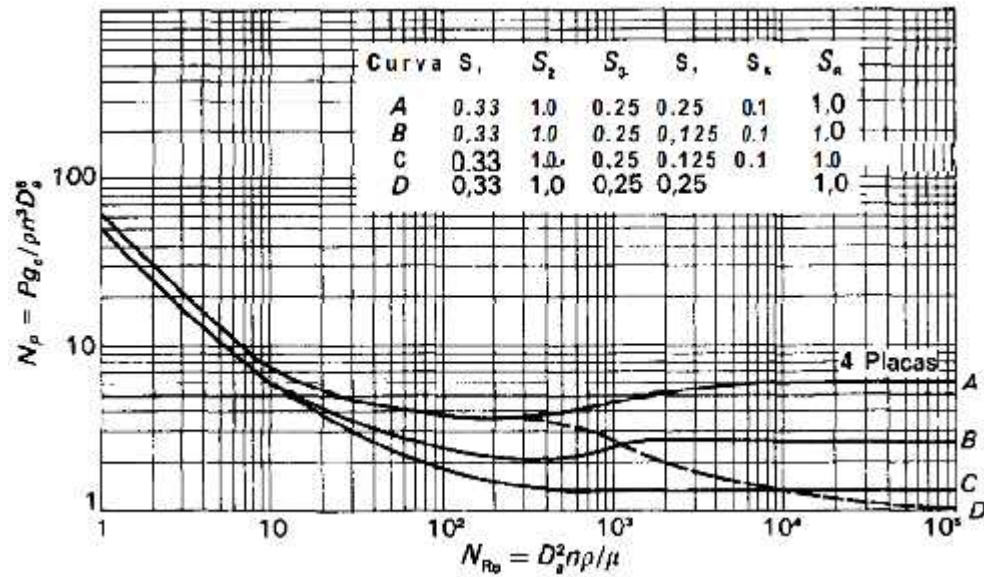
Para determinar la potencia del motor consideramos los siguientes datos:

$D_a = 0,08 \text{ m}$	$n = 180 \text{ rpm} = 3 \text{ r/s}$	$\mu = 19,30 \text{ Pa}\cdot\text{s}$	$d = 1.042 \text{ kg/m}^3$	$G = 9,81 \text{ m/s}^2$
------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	----------------------------	--------------------------

$$R = \frac{D_a^2 \times n \times d}{\mu} = \frac{0,08^2 \times 3 \times 1.042}{19,30}$$

$$R = 1,150$$

Gráfica N°3-1: Relación entre el Número de Reynolds y Número de Potencia



Fuente: Operaciones Unitarias en Ingeniería Química - Warren L. McCabe - J. C. Smith - P. Harriot

Considerando la gráfica anterior, el N_p es: 60

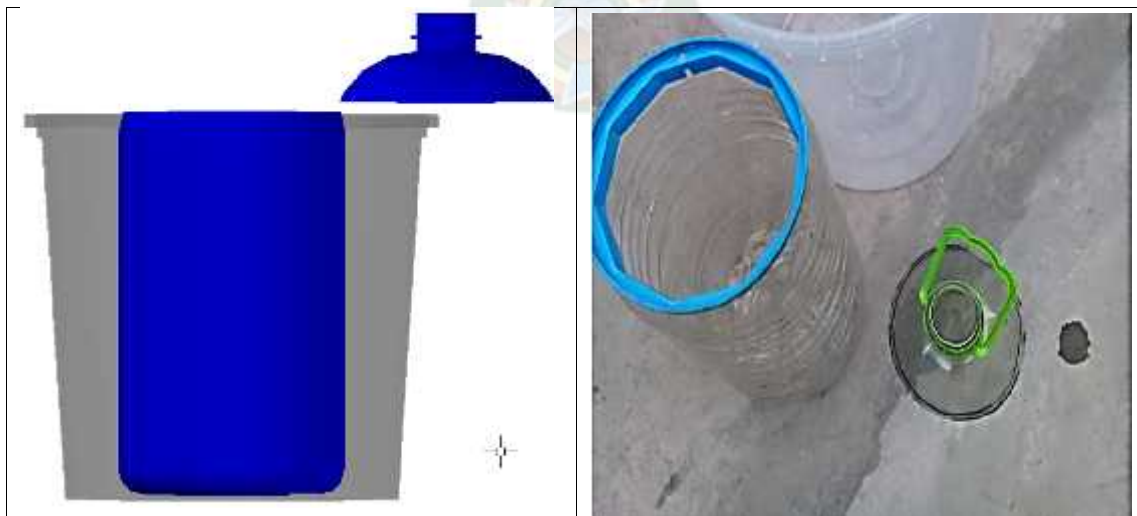
$$P = \frac{D_a^5 \times n^3 \times d \times N_p}{G} = \frac{0,08^5 \times 3^3 \times 1.042 \times 60}{9.81}$$

$$P = 0.564 \text{ W}$$

El agitador de rodete que se diseñara será del tipo de palas verticales para obtener flujo radial.

3.2.3. Instalación del tanque de fermentación

Paso 1. Cortar la botella de forma transversal coincidiendo con la altura del balde.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 2. Perforar por el centro de la base de ambos recipientes y empernarlos juntos con un perno inoxidable, colocar gomas entre el perno y las bases para lograr hermeticidad.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 3. Perforar el costado de los recipientes, un diámetro de $\frac{1}{2}$ plg para que ingrese el accesorio unión simple externa con rosca de sujeción, colocar gomas entre el accesorio y las bases para garantizar la hermeticidad.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 4. Acoplar el tubo de $\frac{1}{2}$ plg al accesorio de unión simple, posteriormente llenar un volumen de 5.0 L, al nivel que llegue se procede a cortar transversalmente el tubo, fijando de esta manera el volumen de operación.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 5. El recipiente con la tapa igual al diámetro de la botella, es cortado rescatando el soporte de la tapa, mediante el uso de silicona se debe colar a la botella cortada.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 6. Cortar en dos partes el balde de 15 L como se muestra en la figura, estas son sujetadas con las barras de madera, a una altura igual a la del balde de 20L.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 7. Colocar las resistencias metálicas de 10 Kohm en la parte inferior de esta estructura, sujetadas con pernos en los extremos para la conexión eléctrica.



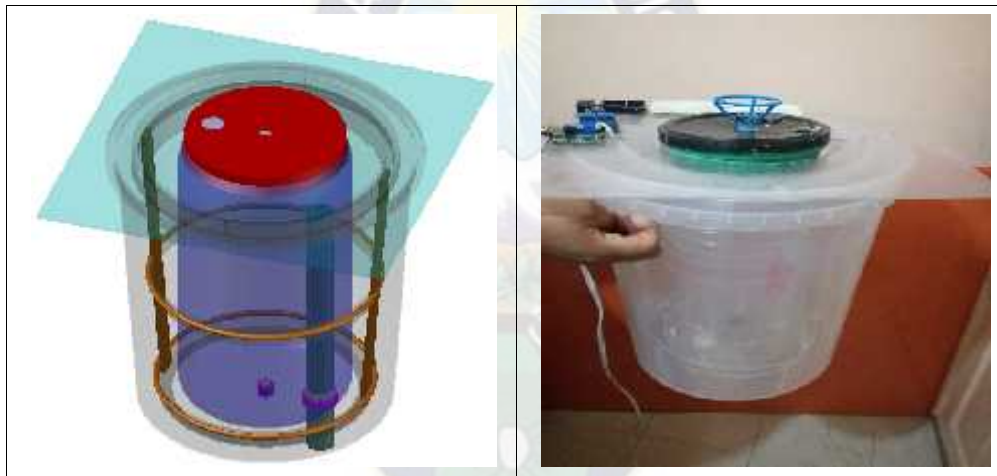
Fuente: Registro propio, 2019

Paso 8. Cortar una circunferencia con diámetro igual al de la botella en una placa plástica de 35x35cm, posteriormente empernarlo a los baldes de 20 y 15L.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 9. Diseño final del tanque de fermentación.



Fuente: Registro propio, 2019

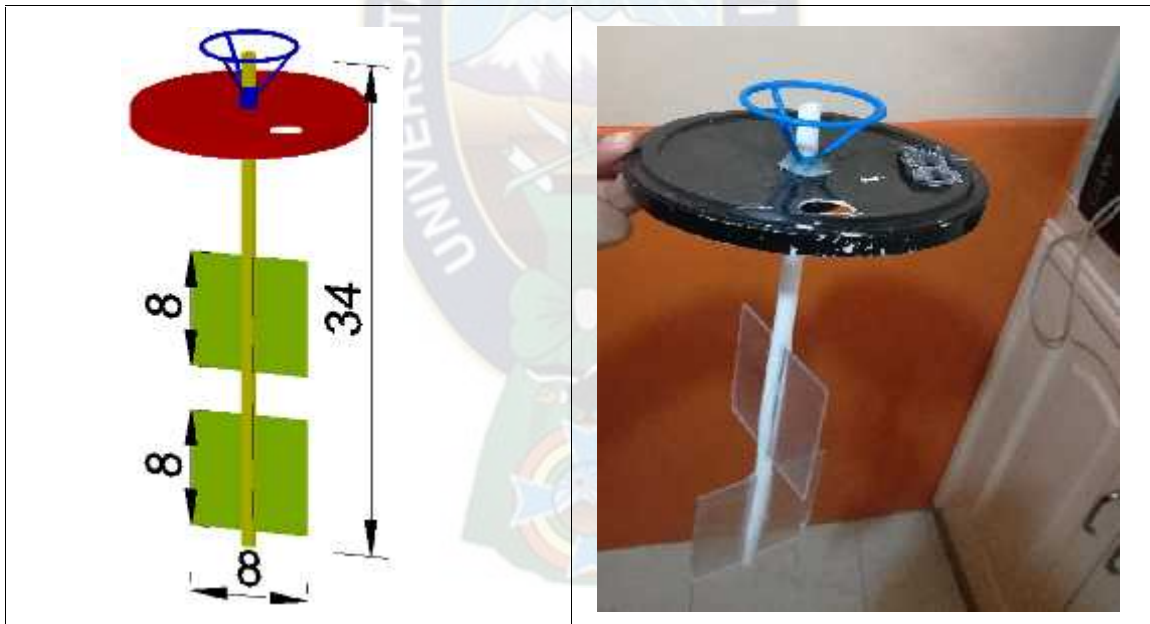
3.2.4. Instalación del agitador

Paso 1. Perforar la nueva tapa para que ingrese el eje del tubo de plástico y colarlo con silicona buscando un ángulo de 90° .



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 2. Medir la distancia del tubo que ingresa al tanque de fermentación y la distancia a la que será sujeta por el motor. Cortar los laterales del tubo que ingresa al fermentador para entrelazarse con las placas de plástico de 8x8 cm.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 3. Colocar un soporte de plástico para el motor-reductor, perforar en tres lugares colineales céntricos para el ingreso del eje y los tornillos de sujeción del motor-reductor.



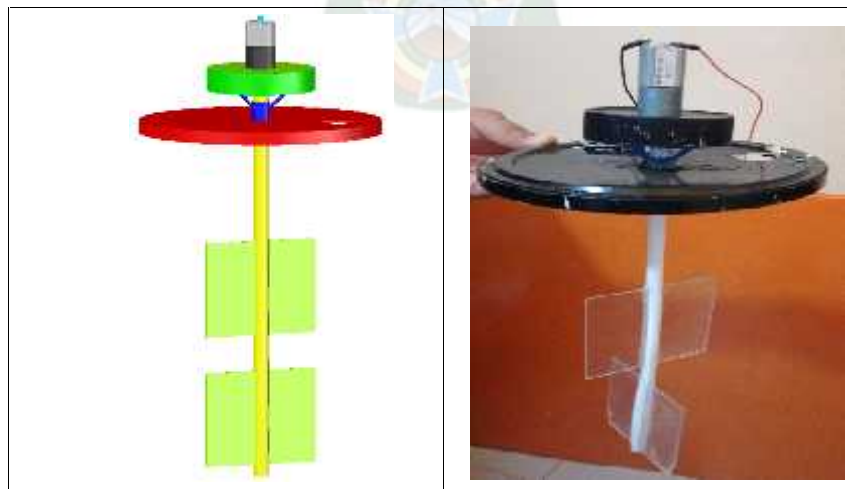
Fuente: Registro propio, 2019

Paso 4. Sujetar el eje del agitador con el eje del motor usando abrazadera de 3/8 plg.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 5. Diseño final del agitador



Fuente: Registro propio, 2019

3.2.5. Instalación del tanque de alimentación

Paso 1. Perforar el balde de 20L para que ingrese el accesorio unión simple externo y colarlo con silicona.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 2. Armar los accesorios como se muestra en las figura.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 3. Perforar la tapa del fermentador para acoplar el accesorio unión simple externo.



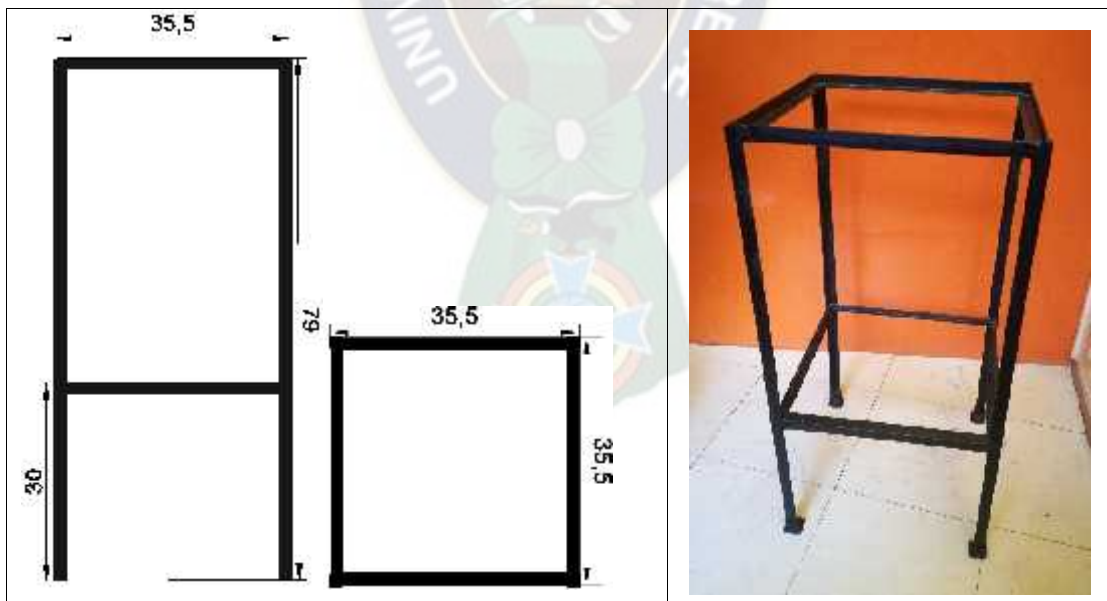
Paso 4. Diseño final del tanque de alimentación



Fuente: Registro propio, 2019

3.2.6. Estructura de soporte

Paso 1. Construir con la barra angular de $\frac{3}{4}$ plg la estructura que soporte todo el sistema, soldar y amolar las esquinas, considerar las acotaciones realizadas en los planos.



Fuente: Registro propio, 2019

Paso 2. Las placas de madera deben ser colocadas en la parte superior y en la parte inferior con una perforación para el tubo de descarga del tanque de fermentación.



Fuente: Registro propio, 2019

3.2.7. Instalación de los micro-controladores

El sistema consiste en la instalación de diferentes dispositivos electrónicos como ser:

- Placa de ARDUINO UNO.
- Sensor de temperatura DS18B20, sensor de FLUJO YF-S201, sensor NIVEL Ultra-Sónico HC-SR04, sensor turbidímetro y sensor pH.
- Actuadores módulo RELAY.



Nota: Para el pH-metro y turbidímetro se conecta un switch para apagar cuando no se registre lecturas y se enciende manualmente cuando se registre la lectura del sensor.

En función de su manual Data Sheet (hoja técnica) se realizó las conexiones para su funcionamiento y su programación.

3.2. MICRO-CONTROLADORES

3.3.1. Características técnicas de un sensor

Un sensor es un dispositivo capaz de detectar magnitudes físicas o químicas, llamadas variables de instrumentación, y transformarlas en variables eléctricas. Las variables de instrumentación pueden ser por ejemplo: temperatura, intensidad lumínica, distancia, aceleración, inclinación, desplazamiento, presión, fuerza, torsión, humedad, movimiento, pH, etc. Una magnitud eléctrica puede ser una resistencia eléctrica (como en una RTD), una capacidad eléctrica (como en un sensor de humedad o un sensor capacitivo), una tensión eléctrica (como en un termopar), una corriente eléctrica (como en un fototransistor), etc.

Los sensores se pueden clasificar en función de los datos de salida en: digitales y analógicos, sus características son:

- Rango de medida: dominio en la magnitud medida en el que puede aplicarse el sensor.
- Precisión: es el error de medida máximo esperado.
- *Offset* o desviación de cero: valor de la variable de salida cuando la variable de entrada es nula. Si el rango de medida no llega a valores nulos de la variable de entrada, habitualmente se establece otro punto de referencia para definir el *offset*. (down)
- Linealidad o correlación lineal.
- Sensibilidad de un sensor: suponiendo que es de entrada a salida y la variación de la magnitud de entrada.
- Resolución: mínima variación de la magnitud de entrada que puede detectarse a la salida.
- Rapidez de respuesta: puede ser un tiempo fijo o depender de cuánto varíe la magnitud a medir. Depende de la capacidad del sistema para seguir las variaciones de la magnitud de entrada.

Un sensor es un tipo de transductor que transforma la magnitud que se quiere medir o controlar, en otra, que facilita su medida. Pueden ser de indicación directa (ej. un termómetro de mercurio) o pueden estar conectados a un indicador (posiblemente a través

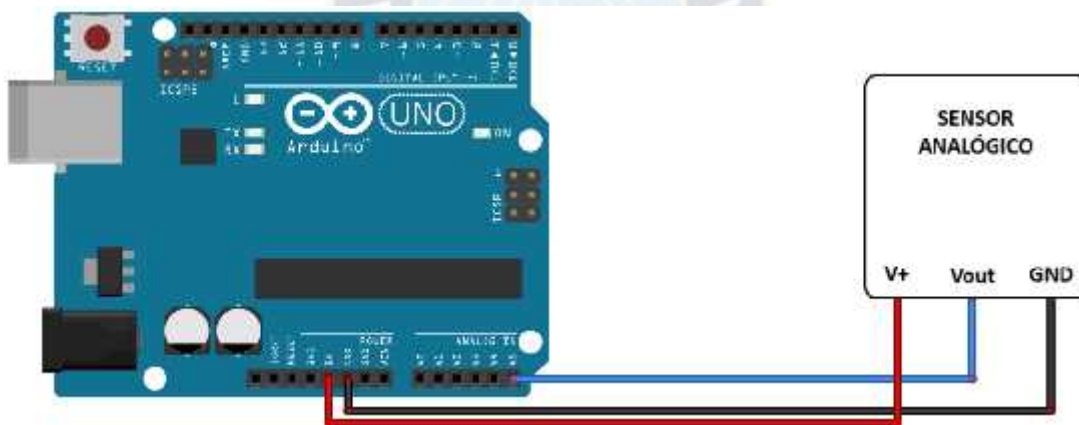
de un convertidor analógico a digital, un computador y un visualizador) de modo que los valores detectados puedan ser leídos por un humano.

Por lo general, la señal de salida de estos sensores no es apta para su lectura directa y a veces tampoco para su procesado, por lo que se usa un circuito de acondicionamiento, por ejemplo un puente de Wheatstone, amplificadores y filtros electrónicos que adaptan la señal a los niveles apropiados para el resto de los circuitos.

Los sensores analógicos normalmente se componen de tres pins: positivo, tierra y salida de voltaje analógica. Esta salida de voltaje es directamente proporcional a la variable de medida del sensor (lineal).

Las placas Arduino disponen de varias entradas analógicas, la mayoría de sensores analógicos se pueden alimentar a 5V por lo que su voltaje máximo de salida será este.

Imagen N°3-1: Conexión de sensores en la Placa Arduino



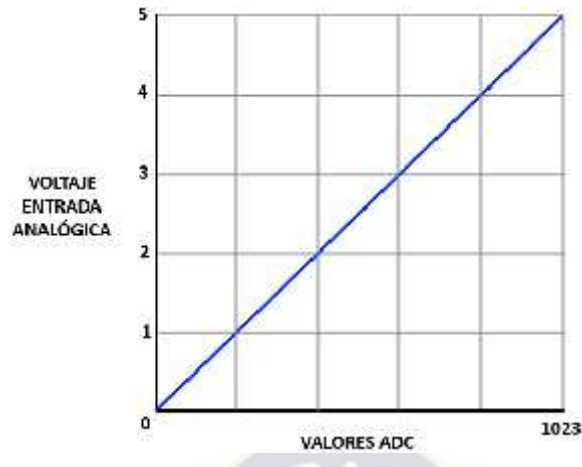
Fuente: <https://www.arduino.cc>

Para obtener la variable del sensor en el código Arduino, se deben seguir 3 pasos:

1. ADC del voltaje analógico procedente del sensor.
2. Obtener el voltaje del sensor
3. Obtener la variable del sensor

Paso 1 – ADC (Analog-to-Digital Converter)

Cuando entra un voltaje analógico en un pin de Arduino, este hace la conversión de analógico a digital (ADC). Quiere decir que convierte el voltaje de entrada 0-5V en valores enteros comprendidos entre 0-1023, $2^{10} = 1024$ valores (de 0 a 1023, las entradas analógicas de Arduino son de 10 bits)

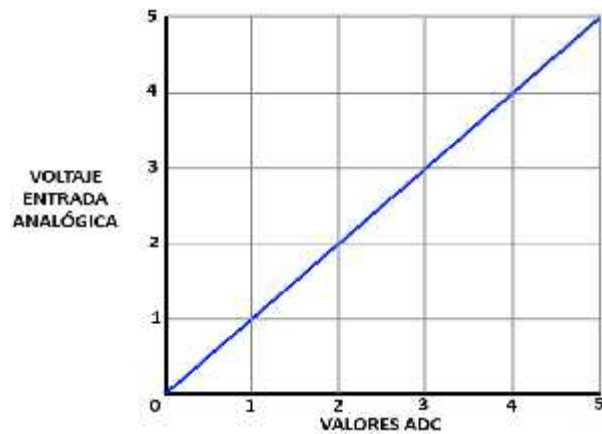


Paso 2 – Obtener el voltaje del sensor

El siguiente paso es convertir estos valores nuevamente a voltaje, para esto se tiene que multiplicar el valor leído del pin analógico por 5 (que son los 5V máximo que da el sensor) y dividirlo entre 1023 (que es el valor más grande dentro del rango de 10 bits). La fórmula sería la siguiente:

$$V = \frac{V_{A} \times 5}{1023}$$

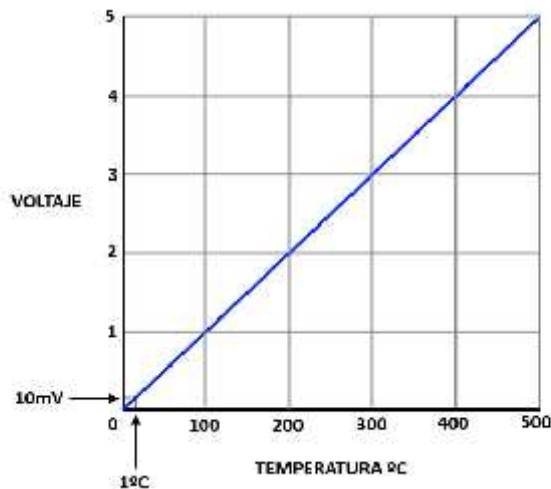
De este modo, tenemos relacionada el voltaje de salida del sensor con los valores digitales de Arduino.



Paso 3 – Obtener la variable del sensor

El último paso es obtener la variable de medida del sensor. Para calcular esta, tenemos que saber la relación voltaje/variable del sensor, esta información la encontraremos en el datasheet del sensor.

A través de esta información, tenemos que encontrar la relación de 1V ya que la escala que usamos con Arduino es de voltio en voltio.



Con esto, tenemos que multiplicar el voltaje obtenido en el paso anterior por el valor de la relación voltaje-variable (en este caso 100) y obtendremos la variable de medida del sensor.

$$\text{Variable} = \text{Voltaje} * \text{relación Voltaje/Variable}$$

Código fuente – Arduino

Ahora haremos el código de Arduino haciendo cada paso descrito anteriormente usando para este ejemplo el sensor LM35, aunque este código puede servir también como plantilla para conectar cualquier sensor analógico.

```
#define pin_sensor A5 //Pin del sensor
float adc; //Variable para obtener los valores en el 1 paso
float voltaje; //Variable para obtener el voltaje en el 2 paso
float variable; //Variable final del sensor en el 3 paso
float rel_voltaje_variable = 100.00; //Relación Voltaje/Variable del sensor (en el caso)

void setup()
{
  Serial.begin(9600);
}

void loop()
{
  //Paso 1, conversión ADC de la lectura del pin analógico
  adc = analogRead(pin_sensor);
  Serial.println(adc);

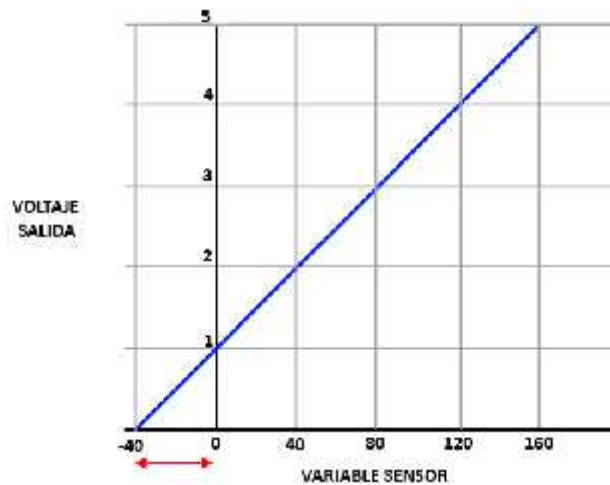
  //Paso 2, obtener el voltaje
  voltaje = adc * 5 / 1023;
  Serial.println(voltaje);

  //Paso 3, obtener la variable de medida del sensor
  variable = voltaje * rel_voltaje_variable;
  Serial.println(variable);

  delay(1000);
}
```

Sensores con mediciones negativas

Hay sensores que pueden medir variables con valor negativo. Por ejemplo tenemos un sensor que su gráfica voltaje/variable es la siguiente:



Para poder medir estos valores negativos con Arduino, hay que localizar el offset. El offset se puede apreciar en la gráfica, es el punto que la línea cruza el eje vertical (voltaje). En nuestro sensor, el offset es 1V. El offset lo tenemos que restarlo con el voltaje en el último paso.

```

9  #define pin_sensor A5 //Pin del sensor
10 float adc; //Variable para obtener los valores en el 1 paso
11 float voltaje; //Variable para obtener el voltaje en el 2 paso
12 float variable; //Variable final del sensor en el 3 paso
13 float rel_voltaje_variable = 40.00; //Relación Voltaje/Variable del sensor
14 float offset = 1.00; //Offset
15
16 void setup()
17 {
18   Serial.begin(9600);
19 }
20
21 void loop()
22 {
23   //Paso 1, conversión ADC de la lectura del pin analógico
24   adc = analogRead(pin_sensor);
25   Serial.println(adc);
26
27   //Paso 2, obtener el voltaje
28   voltaje = adc * 5 / 1023;
29   Serial.println(voltaje);
30
31   //Paso 3, obtener la variable de medida del sensor
32   variable = ((voltaje - offset) * rel_voltaje_variable);
33   Serial.println(variable);
34
35   delay(1000);
36 }

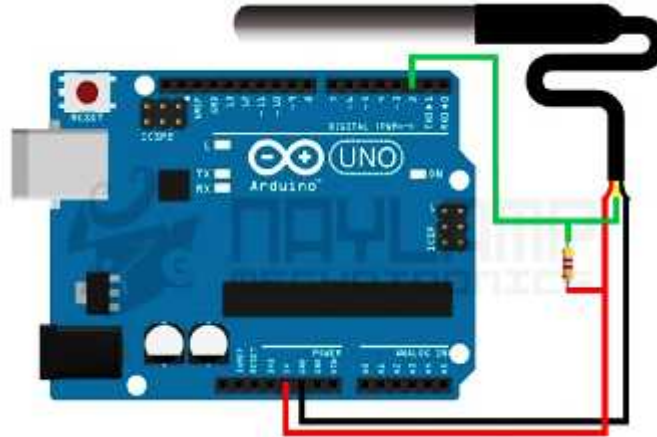
```

Se debe cambiar el valor de la relación voltaje/variable. En este caso tenemos que 1V equivale a 40 (variable del sensor). Esto lo podemos aplicar a cualquier sensor que su gráfica voltaje/variable mida valores negativos.

3.3.1.1. Calibración del sensor de Temperatura DS18B20

Conectar el sensor como se muestra en la siguiente imagen:

Imagen N°3-1: Conexión del sensor Temperatura DS18B20 a la Placa Arduino



Fuente: <https://www.arduino.cc>

El sensor puede medir temperaturas desde los -55°C hasta los 125°C , nótese que es necesario poner una resistencia Pull-Up de 4.7K (establece un estado HIGH), esta resistencia establece un estado lógico en un pin o entrada de un circuito lógico cuando se encuentra en estado reposo, esta configuración evita que en estado de reposo se mida un valor erróneo eliminando la influencia de factores externos sobre las mediciones.

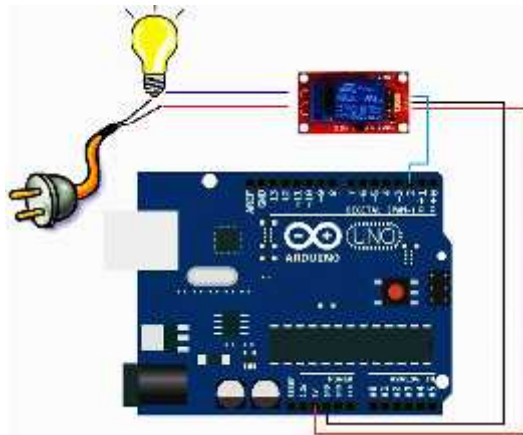
Para poder trabajar el DS18B20 en Arduino se necesita dos librerías:

- Librería **OneWire**, en esta librería está implementado todo el protocolo del bus 1-wire, puede usarse tanto para el DS18B20 como para otros dispositivos, 1-wire es un protocolo de comunicaciones en serie basado en un bus, un maestro y varios esclavos de un sola línea de datos que se utilizan para el intercambio de datos.
- Librería **DallasTemperature**, en esta librería están implementadas las funciones necesarias para poder realizar las lecturas o configuraciones del DS18B20.

Después de instalar las librerías y realizar la conexión podemos realizar las lecturas de temperatura.

Considerando que la Temperatura debe ser controlada para el acondicionamiento de los microorganismos, a la programación se añade el funcionamiento de un módulo Relay quien es el encargado de desconectar de forma automática la calefacción.

Imagen N°3-2: Conexión del módulo Relay a la Placa Arduino

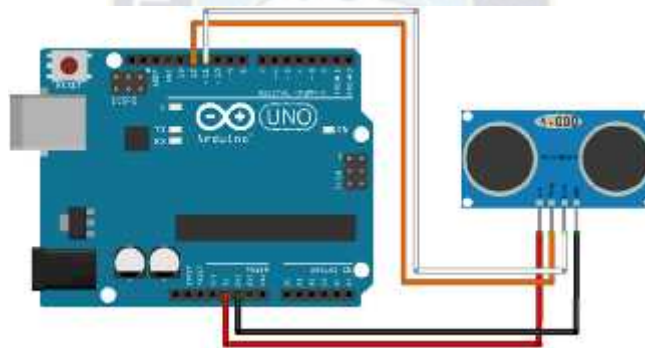


Fuente: <https://www.arduino.cc>

3.3.1.2. Calibración del sensor de Nivel

Conectar el sensor como se muestra en la siguiente imagen:

Imagen N°3-3: Conexión del sensor de Nivel a la Placa Arduino

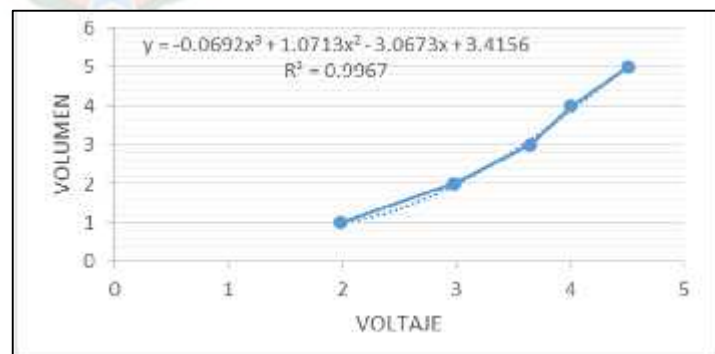


Fuente: <https://www.arduino.cc>

Los datos obtenidos de la calibración son:

Gráfica N°3-2: Calibración sensor de nivel

V (L)	H (mm)	VOLTAJE (V)
1	263	1.98
2	211	2.98
3	161	3.65
4	118	4.01
5	71	4.51



Fuente: Elaboración propia, 2019

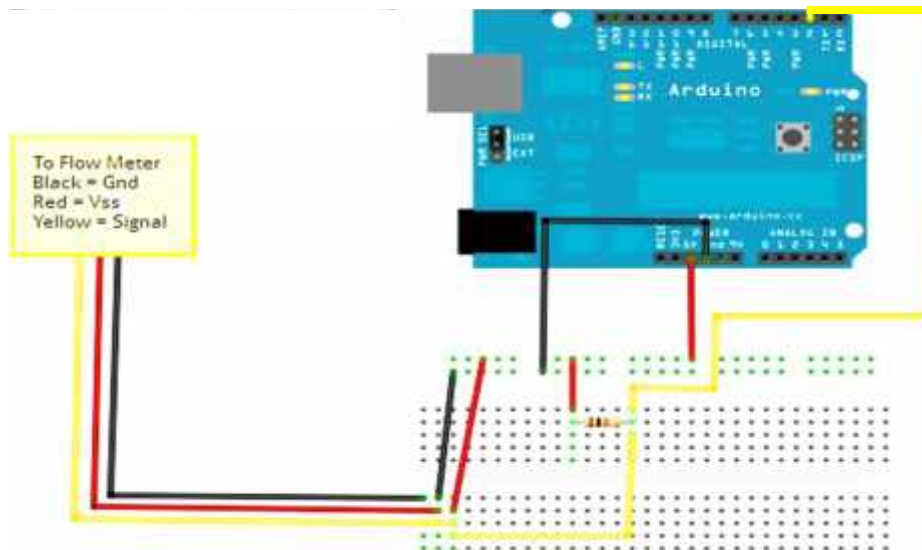
Ecuación de calibración del sensor es:

$$Vol = -0.0692*V^3+1.0713*V^2-3.0673*V+3.4156 \quad \text{Donde: Vol: [L] \quad V: [Voltios]}$$

3.3.1.3. Calibración del sensor de Flujo

Conectar el sensor como se muestra en la siguiente imagen:

Imagen N°3-4: Conexión del sensor de Flujo a la Placa Arduino



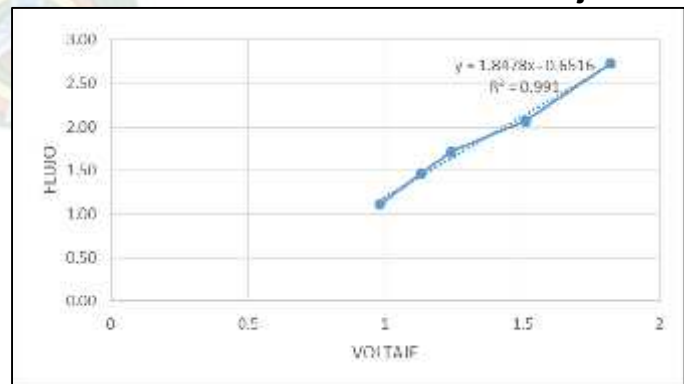
Fuente: <https://www.arduino.cc>

Se conecta a un grifo de pila, se mantiene un flujo constante y en un tiempo cero se mide el tiempo en llenar un volumen de 1L, el cociente será el flujo del sensor, posterior a eso se mide el voltaje a ese flujo del sensor, se repite el procedimiento para diferentes flujos.

Los datos obtenidos de la calibración son:

VOL [L]	TIEMPO [s]	FLUJO L/min	VOLTAJE
1	54	1.11	0.98
2	41	1.46	1.13
3	35	1.71	1.24
4	29	2.07	1.51
5	22	2.73	1.82

Gráfica N°3-3: Calibración sensor de flujo



Fuente: Elaboración propia, 2019

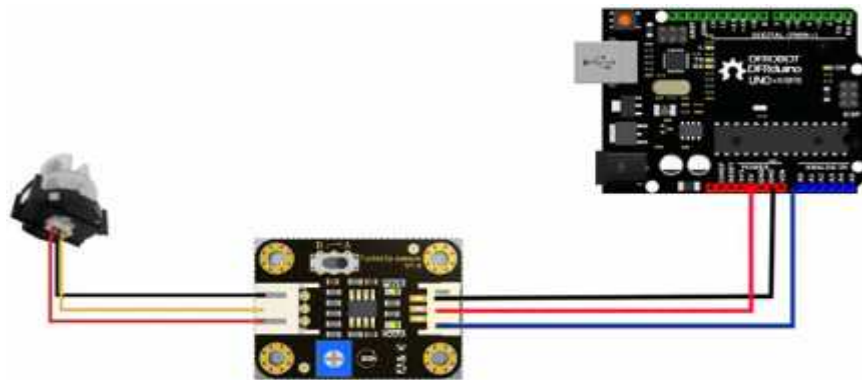
Ecuación de calibración del sensor de flujo:

$$Q = 1.8478 \cdot V - 0.6516 \quad \text{Donde: } Q: [\text{L/min}] \quad V: [\text{Voltios}]$$

3.3.1.4. Calibración del sensor de Turbidez

Conectar el sensor como se muestra en la siguiente imagen:

Imagen N°3-5: Conexión del sensor de Turbidez a la Placa Arduino



Fuente: <https://www.arduino.cc>

Físicamente la leche es una solución turbia porque tiene sólidos totales no disueltos, su concentración está disponible en los envases (información nutricional). El yogurt sigue siendo leche pero contiene mayor cantidad de sólidos totales, en tal sentido es más turbia, con este criterio se determinará la concentración en el yogurt.



Cuadro N°3-1: Información Nutricional de la leche líquida

NUTRIENTE	UNIDAD	100 ML	140 ML	100 ML
Aporte energético	kcal	48.4	77.3	54.8
Proteína	g	3.1	4.2	2.9
Grasa total	g	2.0	3.92	2.8
Carbohidratos totales	g	4.5	6.3	4.5
Calcio	mg	110	140	115
Sólidos Totales	g/L	97.1	104.0	103.2
PROMEDIO	g/L		101	

Fuente: <https://pilandina.com.bo/productos/>

La alta cantidad de sólidos totales, hace necesario que cada muestra sea diluida en un volumen de 100 mL, la dilución a aplicar se realiza por medio de la siguiente ecuación:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$0.5 \text{ mL} \times 101 \text{ g/L} = (0.5 + 99.5) \text{ mL} \times C_2 \quad C_2 = 0.5 \text{ g/L} \quad V = 4.07 \text{ Voltios}$$

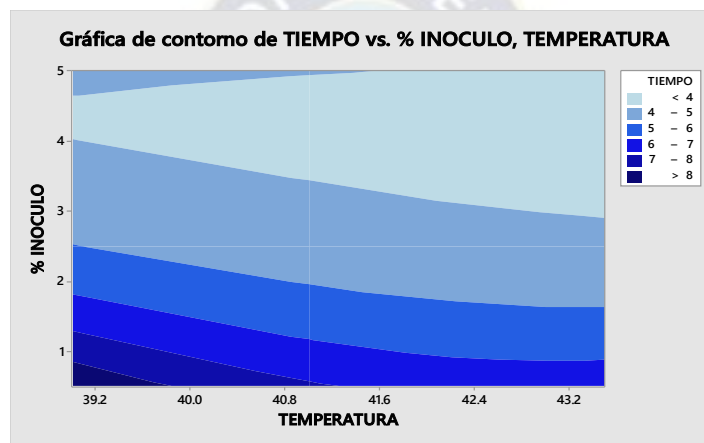
$$1.0 \text{ mL} \times 101 \text{ g/L} = (1.0 + 99.0) \text{ mL} \times C_2 \quad C_2 = 1.0 \text{ g/L} \quad V = 3.91 \text{ Voltios}$$

$$1.5 \text{ mL} \times 101 \text{ g/L} = (1.5 + 98.5) \text{ mL} \times C_2 \quad C_2 = 1.5 \text{ g/L} \quad V = 3.77 \text{ Voltios}$$

$$2.0 \text{ mL} \times 101 \text{ g/L} = (2.0 + 98.0) \text{ mL} \times C_2 \quad C_2 = 2.0 \text{ g/L} \quad V = 3.47 \text{ Voltios}$$

$$2.5 \text{ mL} \times 101 \text{ g/L} = (2.5 + 97.5) \text{ mL} \times C_2$$

Gráfica N°3-3: Tiempo vs % Inoculo, temperatura



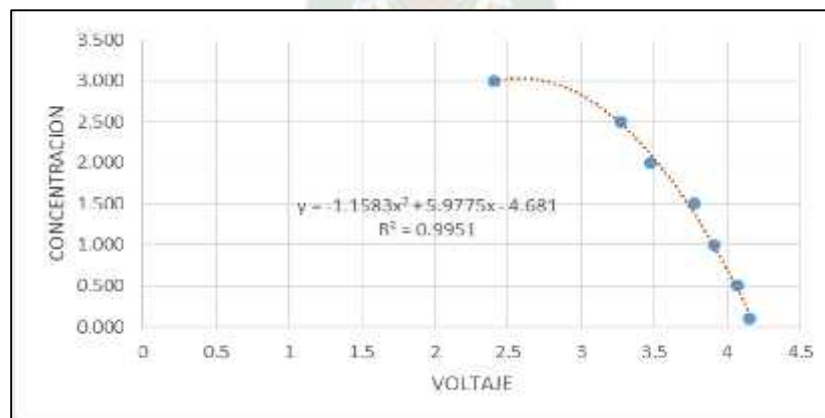
Fuente: Elaboración propia, 2019

$$C_2 = 2.5 \text{ g/L} \quad V = 3.27 \text{ Voltios}$$

$$3.0 \text{ mL} \times 101 \text{ g/L} = (3.0 + 97.0) \text{ mL} \times C_2 \quad C_2 = 3.0 \text{ g/L} \quad V = 2.40 \text{ Voltios}$$

Gráfica obtenida de la calibración:

Gráfica N°3-4: Concentración vs Voltaje



Fuente: Elaboración propia, 2019

Ecuación de calibración del sensor de turbidez:

$$C = -1.1583 \cdot V^2 + 5.9775 \cdot V - 4.681 \quad \text{Donde: } C: [\text{g/L}] ; V: [\text{Voltios}]$$

Se toma 1 mL de yogurt comercial, se diluye en 100 mL y se determina que tiene un voltaje de 3.415 V equivalente a 222.4 g/L, por lo tanto las muestras de yogurt solo se diluirá en 100 mL de agua.

Comparamos el valor obtenido con el valor nutricional del yogurt comercial:



Cuadro N°3-2: Información Nutricional del yogurt

NUTRIENTE	UNIDAD	Por 100 g	Por 100 mL	Por 100 mL	Por 100 g
Valor energético	kcal	98	85.4	76	84
Proteínas	G	3.4	3.3	2.5	3
Carbohidratos totales	G	13.9	12.7	12	12
Grasa total	G	3.2	2.8	2.15	2.7
Calcio	Mg	133	155.2	80	88
Fósforo	Mg	112	82.1	55	65
Sólidos Totales	g/L	216.6	190.4	167.9	186.4
PROMEDIO	g/L	190.3			

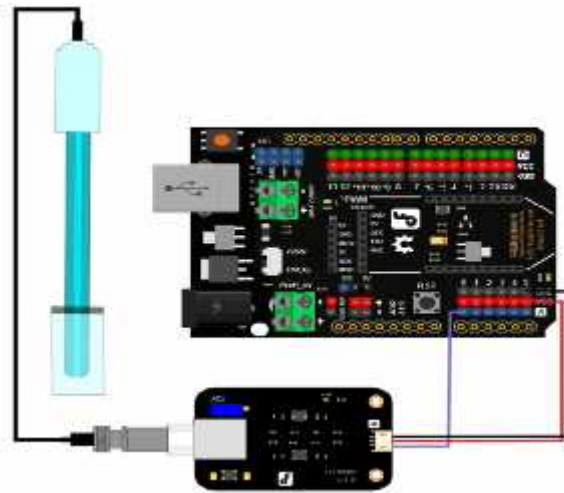
Fuente: <https://pilandina.com.bo/productos/>

La concentración de sólidos según la información nutricional del yogurt comercial es menor a la obtenida con el turbidímetro, debido a que en la información nutricional no hace mención de los microorganismos presentes.

3.3.1.5. Calibración del sensor de pH

Conectamos el sensor de la siguiente manera:

Imagen N°3-6: Conexión del sensor pH a la Placa Arduino

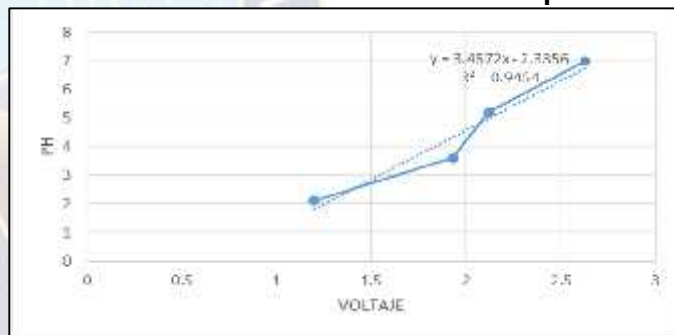


Fuente: <https://www.arduino.cc>

Datos obtenidos de la calibración:

Gráfica N°3-5: Calibración sensor pH

pH	Voltaje
7	2.63
5.2	2.12
3.6	1.93
2.1	1.2



Fuente: Elaboración propia, 2019

Ecuación de calibración del sensor de PH

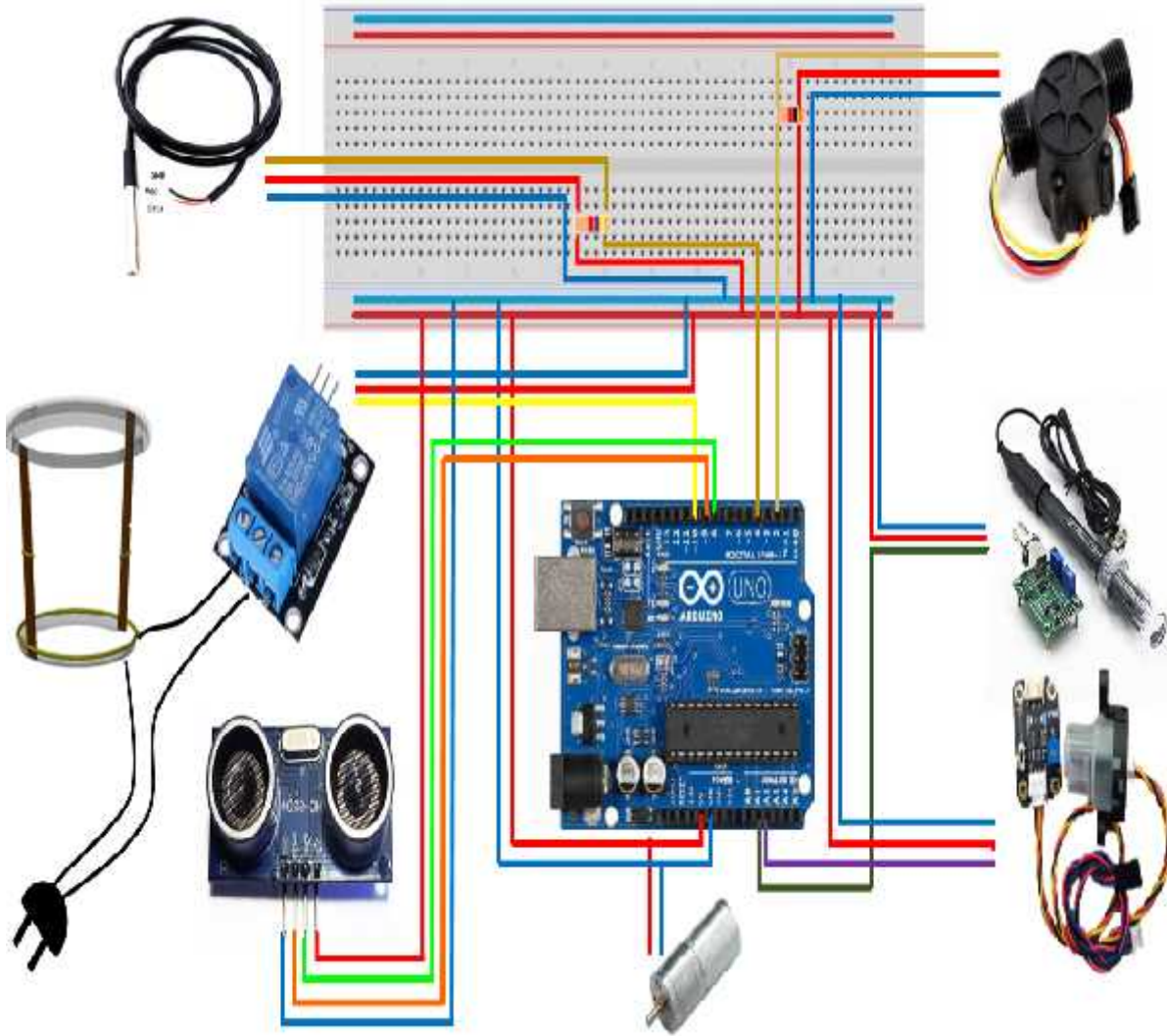
$$PH = 3.4572 \cdot V - 2.3356$$

Donde: PH: []; V: [Voltios]

3.3.2. Sistema Quimiostato

Una vez concluido la construcción del Quimiostato, los sensores son colocados en lugares estratégicos que permitan la medición de los parámetros del sistema y que actúen según el requerimiento del proceso.

Imagen: Conexiones de los micro-controladores para el funcionamiento del Quimiostato



Fuente: Elaboración propia, 2019

El código fuente para la operación de todos los sensores en el Quimiostato se encuentra en el Anexo I.

CAPITULO 4

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. PUESTA EN MARCHA Y PRUEBA EN BLANCO

A continuación describiremos la puesta en marcha del equipo con una prueba en blanco, utilizando solo agua:

- Llenar con agua el tanque de calefacción hasta un nivel de 60-70%.
- Verificar que no haya fugas de agua entre los tanques de operación y calefacción.
- Tapar los tanques con sus respectivas tapas para protección de toques eléctricos.
- Verificar que todos los cables se encuentran conectados y no estén sueltos.
- Conectar el cable de puerto USB con la Placa Arduino.
- Cargar el código fuente para la operación del equipo.
- Establecer el setpoint de la temperatura de trabajo.
- Verificar que los sensores detecten valores y lo muestren la pantalla de la PC.
- Conectar el cable de calefacción (Resistencia de 10 Kohm) a un voltaje de 220V.
- Observar incrementos de temperatura dentro del prototipo construido en el monitor de la PC.
- Llenar un volumen de agua al tanque de operación (30 %) proveniente del tanque de alimentación y esperar a que se mantenga un equilibrio térmico.
- Posterior al equilibrio térmico abrir la válvula de ingreso de flujo y observar la variación en los valores reportados por los sensores.

Si el prototipo funciona correctamente con las indicaciones mencionadas, se encuentra listo para la operación de estudio de este proyecto.

La descripción gráfica de cómo realizar esta operación se encuentra en el ANEXO III.

4.2. CONDICIONES ASÉPTICAS PARA EL ARRANQUE DEL PROCESO

La limpieza, desinfección y posterior esterilización, son procesos primordiales para el correcto funcionamiento de áreas de trabajo donde es necesario tener bajo control la carga microbiana presente, como por ejemplo la industria bioquímica, farmacéutica y la alimenticia.

Para el correcto desarrollo de los experimentos primeramente se debe realizar una limpieza para garantizar las condiciones asépticas del sistema, a continuación se describe el procedimiento realizado:

Esterilización del Ambiente

- Se debe disponer de un ambiente pequeño (2.5 x 2.5 m²).
- Tapar todas las aberturas que posibiliten el ingreso de aire contaminado.
- Debe contar con una ventana pequeña (20 x 20 cm²) para el ingreso de aire, tapado con una tela de porosidad 1mm.
- Colocar alado de la ventana, una estufa o mechero a gas para esterilizar el aire que ingresa.
- Debe contar con una campana y su extractor de aire.
- Encender al mismo tiempo el extractor de aire y la estufa de gas por un tiempo de 45 – 60 minutos con la finalidad de tener un ambiente estéril.
- Dentro del ambiente debe estar: Quimiostato, cocina, garrafa, bañadores, detergentes, Hipoclorito de Sodio (Lavandina), estufa a gas y otros.

Alcanzado un ambiente moderadamente estéril, se procede al lavado del Quimiostato y las demás etapas del proceso.

Lavado y esterilización del Quimiostato

Como se observó en el Capítulo 3, el prototipo construido fue diseñado específicamente para que pueda ser montado cuantas veces se quiera.

- Desmontar el equipo hasta obtener pieza por pieza y separar los componentes eléctrico/electrónico.
- Lavar cada pieza (no eléctrica) con agua y detergente dentro de un bañador.
- Utilizar guantes de goma para preparar una solución al 1% de Hipoclorito de Sodio (Lavandina 5-6%) y lavar todas las piezas e ir montando el prototipo de forma progresiva.
- Los componentes eléctrico/electrónico deben ser limpiados con una esponja que inicialmente tenga detergente, posteriormente la solución de Hipoclorito de Sodio y proceder con el armado.
- Armado el prototipo de Quimiostato, se procede a lavar con agua caliente (85°C) o agua destilada todos los compartimentos por donde ingresará el material de estudio.

Por lo tanto se obtiene prototipo desinfectado en un ambiente moderadamente estéril, listo para el inicio de los procedimientos experimentales.

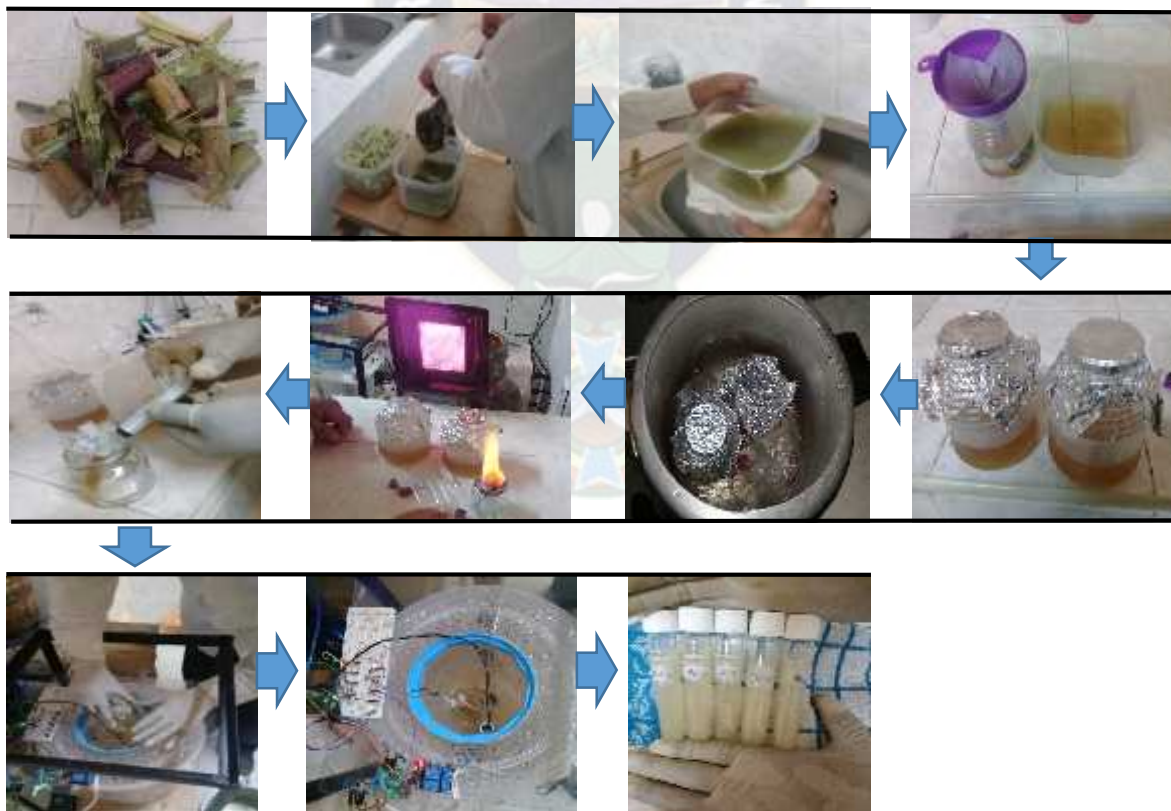
4.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL CON CULTIVO SACHAROMYCES CEREVISIAE

Primeramente se realizó una recolección de caña de azúcar de aproximadamente 4 kg obtenidos en el mercado local para extraer la glucosa y sus nutrientes, y emplearlo como medio de cultivo para el crecimiento de la Sachoromyces Cerevisiae.

El proceso realizado se describe a continuación:

1. Fragmentos de la caña de azúcar
2. Trituración y extracción del caldo natural
3. Filtración de los sólidos del caldo
4. Esterilización del caldo obtenido.
5. Incubación del microorganismo en tubos de ensayo
6. Pasadas las 13 horas no se observa ningún cambio, motivo por el cual se considera que el medio de cultivo no cuenta con los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos, optándose por el cambio del medio de cultivo y/o el cultivo.

Esquema: Procedimiento experimental de la levadura



Fuente: Elaboración propia, 2019

4.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL CON CULTIVO STREPTOCOCCUS THERMOFILUS Y LACTOBACILOS BULGARICOS

4.4.1. Materiales, insumos y equipos.

- Materiales

MATERIALES	CANTIDAD (unidad)
Olla	1
Tela de seda	1 m ²
Jarra graduada	1
Cucharon de madera	1
Vaso precipitado	1
Tubos de ensayo	12

- Insumos

INSUMOS	CANTIDAD (unidad)
Leche natural	12.0 Lt
Azúcar	100 g
Cultivo de liofilizado	2x1.6 g

- Equipos e instrumentos

EQUIPOS E INSTRUMENTOS	CANTIDAD (unidad)
Lactómetro	1
Refrigerador	1

4.4.2. Preparación del medio de cultivo

⇒ **Recepción**

Se realiza la recepción de 12 litros de leche de vaca natural en un envase limpio, seguidamente se filtra por medio de un colador de tela con el fin de eliminar partículas extrañas.

⇒ **Estandarizado**

El estandarizado se consigue añadiendo a la leche de vaca natural, una pequeña cantidad de leche entera en polvo, esto eleva el valor nutricional del medio de cultivo. En esta operación también se agrega azúcar en la proporción de 50 gramos por litro (12x50=600g).

⇒ **Pasteurización**

La leche se calienta en una olla hasta una temperatura de 86°C durante 20 minutos, para que todas las proteínas del suero precipiten y estas proteínas se convierten en estabilizantes, estos estabilizantes atrapan el agua libre y le dan cuerpo y textura a la biomasa. Es recomendable que la leche se mantenga a esta temperatura en forma constante, porque temperaturas mayores desnaturalizan las proteínas y baja la calidad del producto terminado y temperaturas menores no eliminan la carga bacteriana, y el producto se deteriora por contaminación.

⇒ **Enfriamiento**

Pasado el tiempo de pasteurización, se enfría bruscamente con agua fría en bañadores hasta alcanzar una temperatura de 40-44 °C y se trasvasa al tanque de alimentación que se encuentra en condición estéril y se deja tapado.

Diagrama de Flujo: Preparación del medio de cultivo



Fuente: Elaboración propia, 2019

4.3.3. Preparación de Cultivo Madre

La preparación de un cultivo madre de un volumen de 1.000 mL con una concentración de 180 g/L se realiza mediante el siguiente procedimiento:

- Calentar el tanque de calefacción del Quimiostato hasta 43°C
- Abrir la válvula del tanque de alimentación y llenar el tanque de operación con 1.000 mL de medio de cultivo (Leche).
- Calentar los 1.000 mL de medio de cultivo hasta 43°C
- Paralelamente, en un recipiente estéril se coloca 2.000 mL de medio de cultivo en el cual se adiciona una pequeña cantidad el cultivo Lyofast Y456B (Streptococcus Thermophilus y Lactobacilos Bulgaricos).
- Cuando el medio de cultivo alcanza la temperatura de 43°C se inocula por medio de una jeringa (esterilizada) el cultivo Lyofast Y456B preparado anteriormente.
- Incubar a la temperatura de 43°C por un periodo en el que se alcance una concentración de 180 g/L medidos con el turbidímetro.
- Abrir la válvula de descarga del tanque de operación y descargar el cultivo madre.
- El Cultivo Madre debe ser conservado en refrigerador a una temperatura de 5 °C

Imagen: Empaque del Cultivo Lyofast Y456B



Fuente: Registro propio, 2019

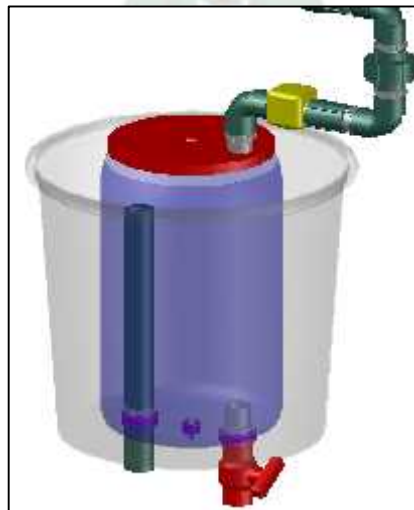
Diagrama de Flujo: Preparación de cultivo Madre



Fuente: Elaboración propia, 2019

NOTA.- El prototipo de Quimiostato construido no cuenta con un sistema de enfriamiento, cuando la biomasa alcanza la concentración requerida (turbidez) se descarga el contenido abriendo la válvula inferior, la biomasa recolectada se almacena en un ambiente frio para su posterior análisis.

Imagen 3: Tanque de operación con dos tipos de descarga según el sistema requerido



Fuente: Elaboración propia, 2019

CAPITULO 5

CÁLCULOS Y RESULTADOS OBTENIDOS

5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este análisis surge de corroborar la información que se tiene en bibliografía en cuanto a la cantidad de inóculo a añadir, todas las metodologías indagadas mencionan que se debe añadir entre el 3 – 5 % de inóculo.

Por medio de un diseño experimental, se desea determinar la cantidad mínima de inóculo a añadir a un medio de cultivo a diferentes temperaturas, con la finalidad de medir el tiempo que requiere alcanzar una concentración (turbidez) mayor 220 g/L de sólidos.

Para este análisis se aplica un diseño 3^2 (dos factores con tres niveles), por lo tanto genera 9 tratamientos.

<u>FACTOR:</u>	<u>NIVEL:</u>
A: TEMPERATURA	a1: 43.5 °C a2: 41.0 °C a3: 39.0 °C
B: % INOCULO A AÑADIR	b1: 5.0 % b2: 2.5 % b3: 0.5 %

Las posibles combinaciones serán:

a1b1	a1b2	a1b3
a2b1	a2b2	a2b3
a3b1	a3b2	a3b3

A continuación se describe la metodología a realizar cada prueba:

5.1.1. Procedimiento experimental

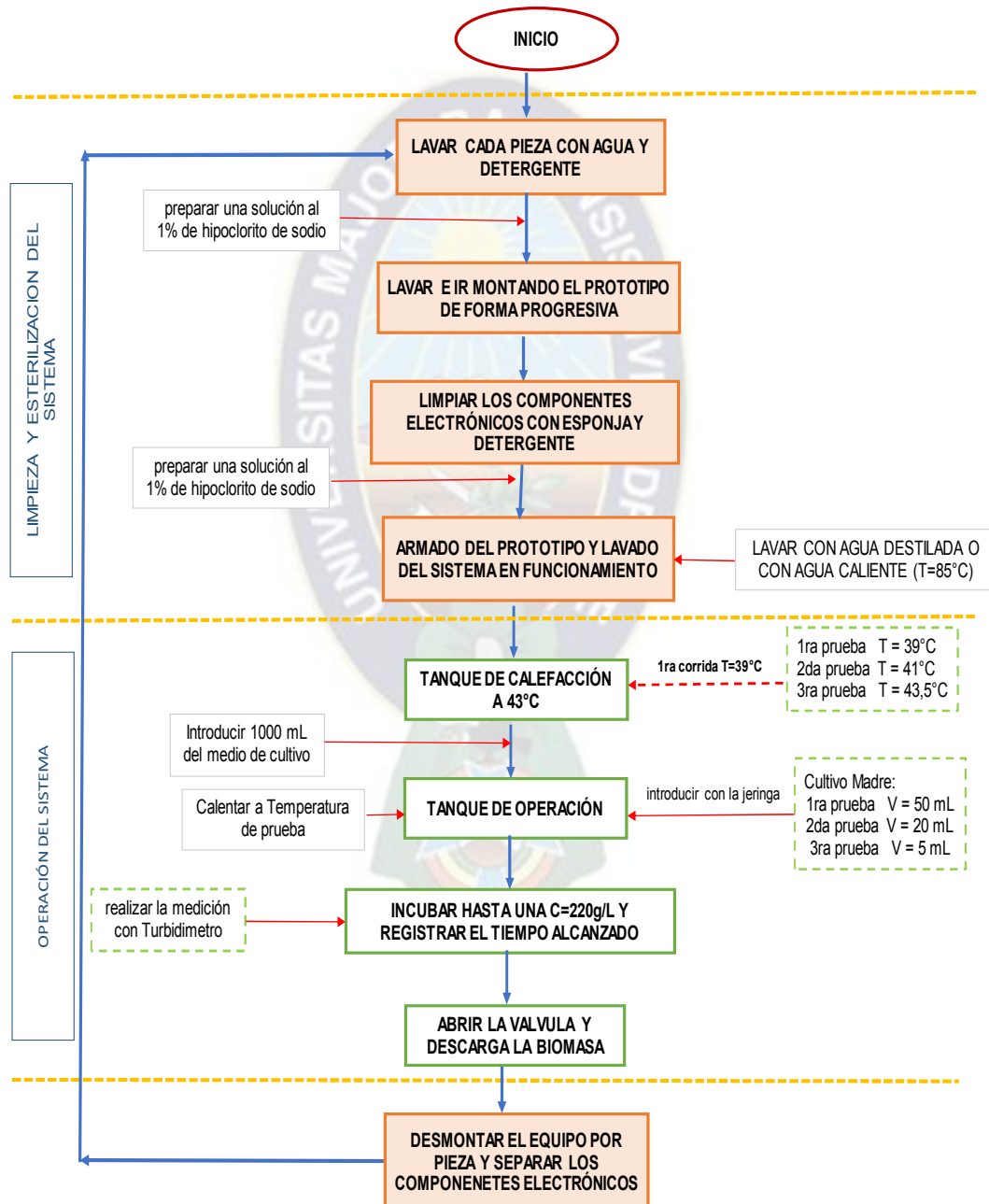
Consiste en preparar un volumen de 1.0 L de leche dentro del tanque de operación del Quimiostato, e inocular a diferentes concentraciones del cultivo madre (5.0%, 2.5%, 0.5%), además el Quimiostato deberá estar a tres diferentes temperaturas (39.0°C, 41.0 °C, 43.5°C), la variable de respuesta es el tiempo en que tarda en alcanzar 220 g/L medidos con el turbidímetro.

Cada cierto tiempo se extraerá 1mL de la mezcla con el dispositivo de extracción de muestra del Quimiostato, se diluirá en 100 mL y se registrará el tiempo que tarda en llegar a la concentración de 220 g/L. El volumen a añadir de la muestra madre al volumen de análisis (1000 mL) según cada porcentaje es:

VOLUMEN A AÑADIR		
Para cada factor de Temperatura: a1, a2, a3		
Inoculación b1: 5.0 %	Inoculación b2: 2.5 %	Inoculación b3: 0.5 %
Vol. inóculo 50 mL	Vol. inóculo 25 mL	Vol. inóculo 5 mL

Fuente: Elaboración propia, 2019

Diagrama de Flujo: Procedimiento experimental



Fuente: Elaboración propia, 2019

5.1.2. Resultados Obtenidos

Resultados obtenidos con la Combinación a1b1:

$$V_{\text{PRUEBA}} = 1000 \text{ mL} \quad C_{\text{SOLIDOS ALCANZADO}} = 220 \text{ g/L}$$

$$a1: T = 43.5^{\circ}\text{C} \quad b1: \%I = 5.0\% (5\text{mL}) \quad t_{\text{ALCANZADO}} = 237 \text{ min}$$

Resultados obtenidos con la Combinación a1b2:

$$V_{\text{PRUEBA}} = 1000 \text{ mL} \quad C_{\text{SOLIDOS ALCANZADO}} = 220 \text{ g/L}$$

$$a1: T = 43.5^{\circ}\text{C} \quad b2: \%I = 2.5\% (25\text{mL}) \quad t_{\text{ALCANZADO}} = 254 \text{ min}$$

Resultados obtenidos con la Combinación a1b3:

$$V_{\text{PRUEBA}} = 1000 \text{ mL} \quad C_{\text{SOLIDOS ALCANZADO}} = 220 \text{ g/L}$$

$$a1: T = 43.5^{\circ}\text{C} \quad b3: \%I = 0.5\% (50\text{mL}) \quad t_{\text{ALCANZADO}} = 397 \text{ min}$$

Resultados obtenidos con la Combinación a2b1:

$$V_{\text{PRUEBA}} = 1000 \text{ mL} \quad C_{\text{SOLIDOS ALCANZADO}} = 220 \text{ g/L}$$

$$a2: T = 41.0^{\circ}\text{C} \quad b1: \%I = 5.0\% (5\text{mL}) \quad t_{\text{ALCANZADO}} = 241 \text{ min}$$

Resultados obtenidos con la Combinación a2b2:

$$V_{\text{PRUEBA}} = 1000 \text{ mL} \quad C_{\text{SOLIDOS ALCANZADO}} = 220 \text{ g/L}$$

$$a2: T = 41.0^{\circ}\text{C} \quad b2: \%I = 2.5\% (25\text{mL}) \quad t_{\text{ALCANZADO}} = 271 \text{ min}$$

Resultados obtenidos con la Combinación a2b3:

$$V_{\text{PRUEBA}} = 1000 \text{ mL} \quad C_{\text{SOLIDOS ALCANZADO}} = 220 \text{ g/L}$$

$$a2: T = 41.0^{\circ}\text{C} \quad b3: \%I = 0.5\% (50\text{mL}) \quad t_{\text{ALCANZADO}} = 428 \text{ min}$$

Resultados obtenidos con la Combinación a3b1:

$$V_{\text{PRUEBA}} = 1000 \text{ mL} \quad C_{\text{SOLIDOS ALCANZADO}} = 220 \text{ g/L}$$

$$a3: T = 39.0^{\circ}\text{C} \quad b1: \%I = 5.0\% (5\text{mL}) \quad t_{\text{ALCANZADO}} = 247 \text{ min}$$

Resultados obtenidos con la Combinación a3b2:

$$V_{\text{PRUEBA}} = 1000 \text{ mL} \quad C_{\text{SOLIDOS ALCANZADO}} = 220 \text{ g/L}$$

a3: T = 39.0°C b2: %I = 2.5% (25mL) t_{ALCANZADO} = 302 min

Resultados obtenidos con la Combinación a3b3:

V_{PRUEBA} = 1000 mL C_{SOLIDOS ALCANZADO} = 220 g/L

a3: T = 39.0°C b3: %I = 0.5% (50mL) t_{ALCANZADO} = 535 min

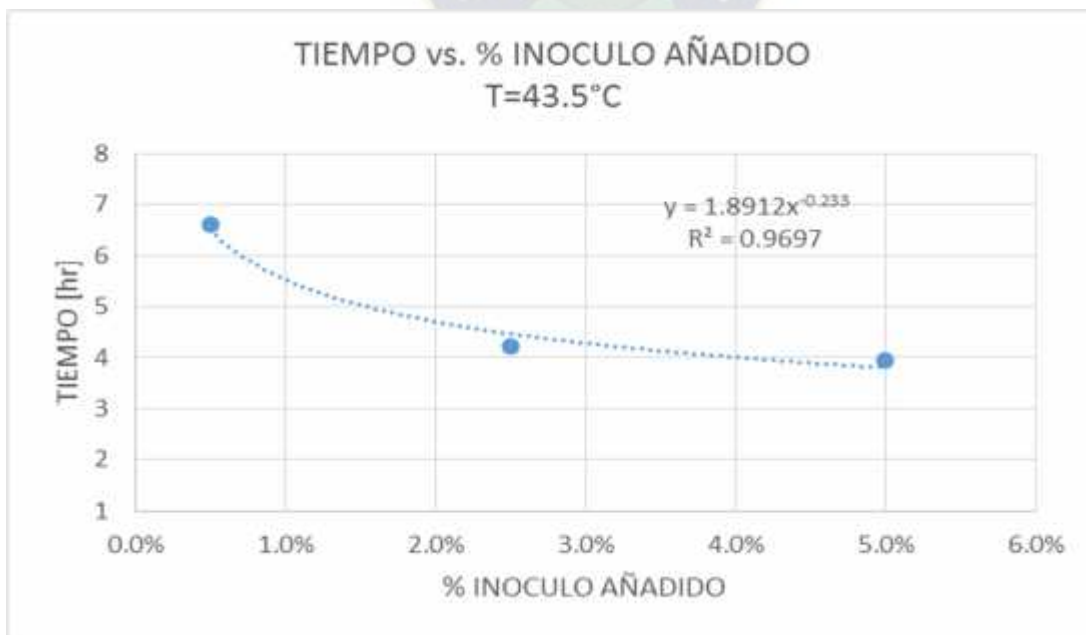
Resumen de los datos obtenidos:

COMBINACIÓN	T °C	% Inóculo	t min	t hr
a1b1	43.5	5.0%	237	3.95
a1b2	43.5	2.5%	254	4.23
a1b3	43.5	0.5%	397	6.61
a2b1	41.0	5.0%	241	4.02
a2b2	41.0	2.5%	271	4.51
a2b3	41.0	0.5%	428	7.13
a3b1	39.0	5.0%	247	4.11
a3b2	39.0	2.5%	302	5.03
a3b3	39.0	0.5%	535	8.92

Fuente: Elaboración propia, 2019

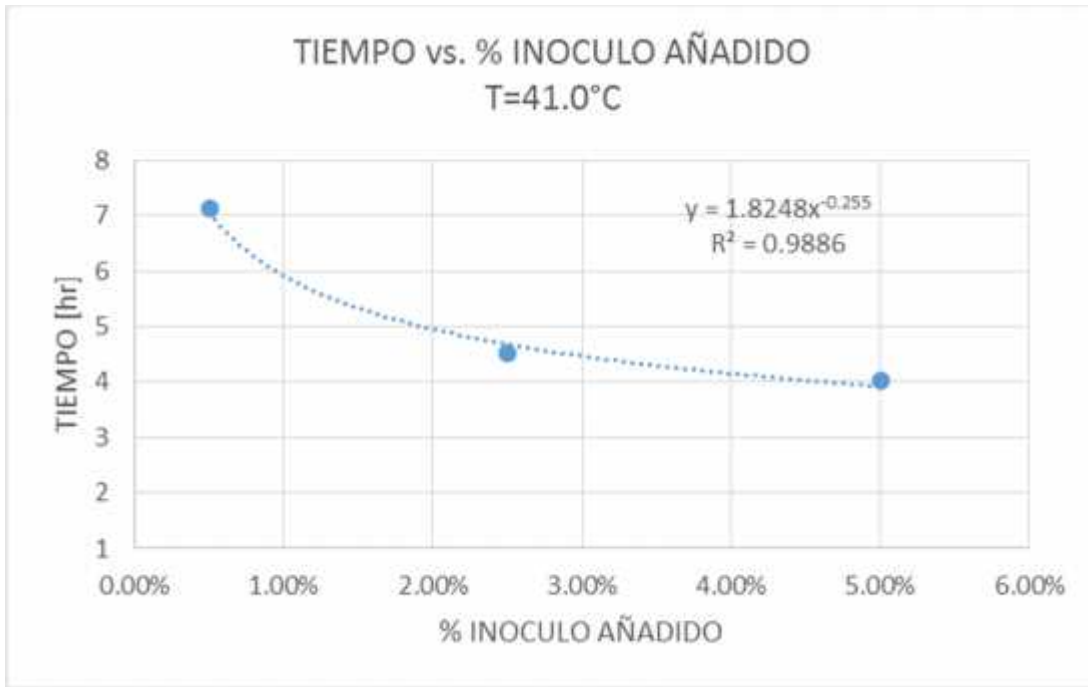
A continuación se grafica las pruebas realizadas para cada valor de temperatura:

Gráfica N°5-1: Tiempo vs % Inoculo Añadido a 43.5 °C



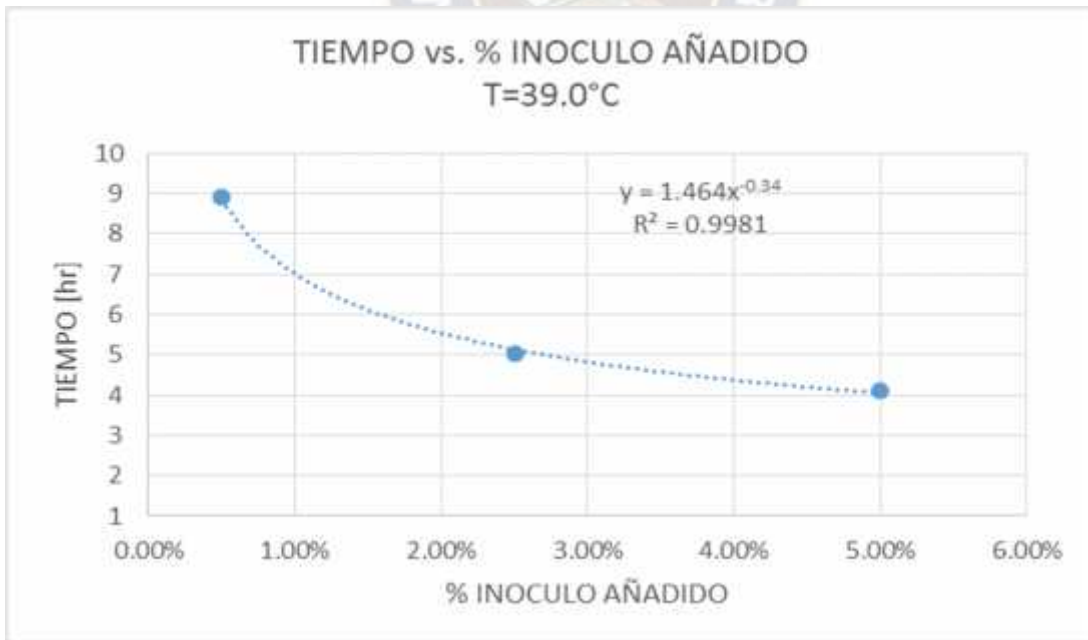
Fuente: Elaboración propia, 2019

Gráfica N°5-2: Tiempo vs % Inoculo Añadido a 41.0 °C



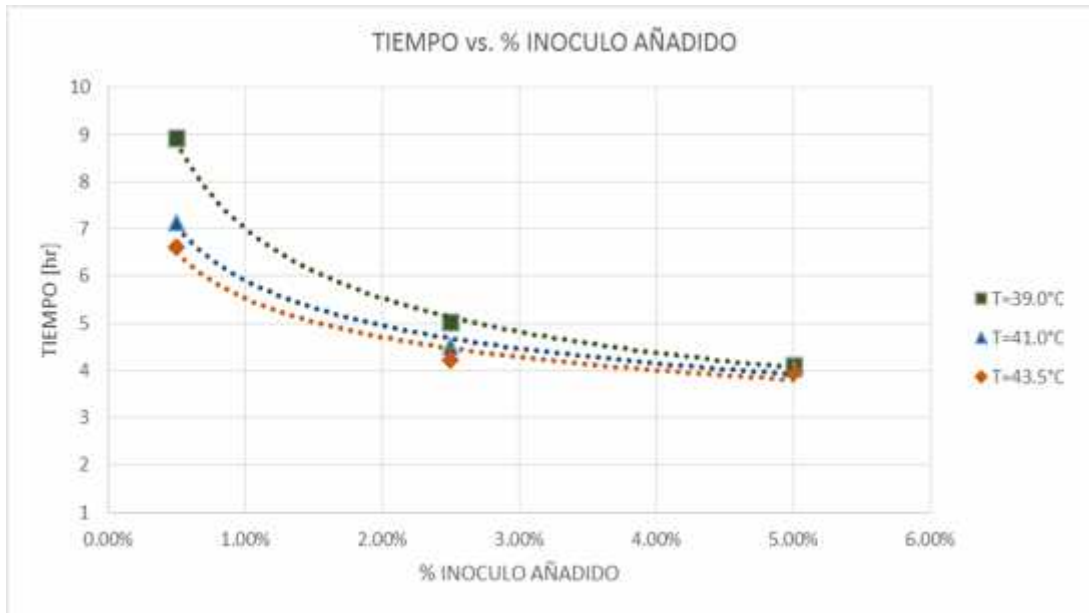
Fuente: Elaboración propia, 2019

Gráfica N°5-3: Tiempo vs % Inoculo Añadido a 39.0 °C



Fuente: Elaboración propia, 2019

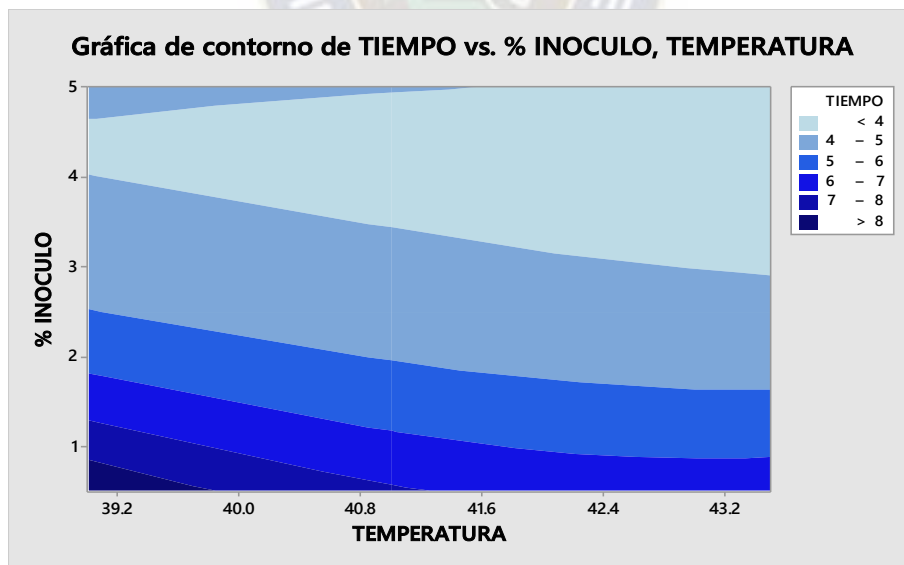
Gráfica N°5-4: Tiempo vs % Inoculo Añadido



Fuente: Elaboración propia, 2019

Se observa que ninguna de las curvas se interseca, por lo tanto el tiempo de crecimiento de los microorganismos está en función de la temperatura a la que se encuentren.

Gráfica N°5-5: Tiempo vs % Inoculo, temperatura

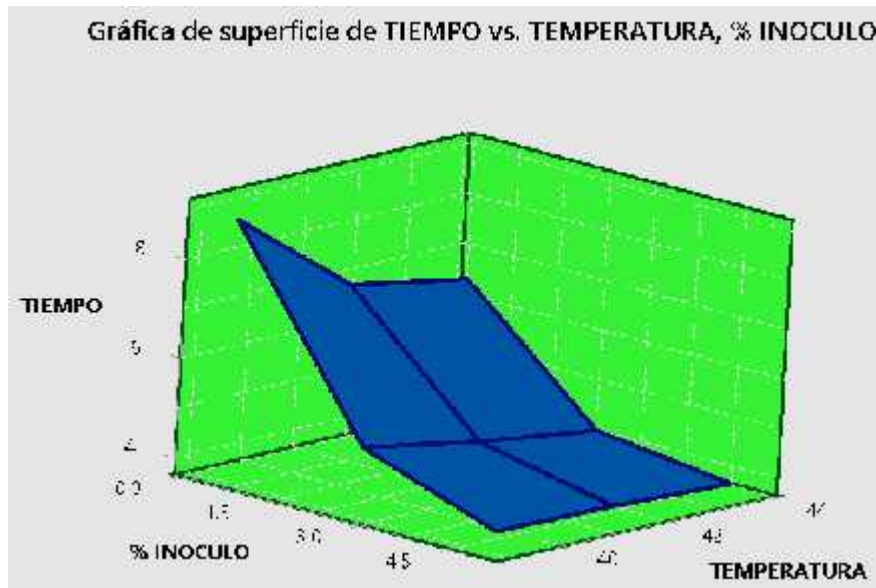


Fuente: Elaboración propia, 2019

Respecto a la cuestión inicial de “3-5% adición de inóculo”, se observa en las gráficas que si se inocula un porcentaje mayor a 5% el tiempo de obtención de biomasa será aproximadamente el mismo que el que se hubiese añadido al 5%, por otra parte, si se

inocula un porcentaje menor al 3% el tiempo de obtención de biomasa se alarga. Se concluye que la adición de cultivo no debe ser mayor a 5% para no incurrir en gastos de cultivo, por otra parte, la adición de cultivo no debe ser menor al 3% para no incurrir en tiempos largos de obtención de biomasa.

Gráfica N°5-6: Tiempo vs temperatura, % inóculo



Fuente: Elaboración propia, 2019

5.2. Obtención de coeficientes cinéticos del proceso

El Modelo de Monod describe la interacción entre el crecimiento de microorganismos en un cultivo por lotes y la utilización del sustrato limitativo del crecimiento en aquellos sistemas donde prácticamente todo el sustrato es transformado en biomasa:

$$\frac{d}{d} = \mu_M \frac{S \cdot B}{K_S + S}$$

$$\frac{d}{d} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{d}{d}$$

$Y_{X/S}$: factor de rendimiento de sustrato en producto, (g células)/(g sustrato).

S: concentración del sustrato limitante, g/Litro.

X: concentración de biomasa, (g células secas/Litro).

μ_{MAX} : velocidad específica máxima de crecimiento, (1/hora).

K_S : constante de saturación, g/litro.

Método diferencial de análisis

El objetivo del método diferencial de análisis es la evaluación de las velocidades de crecimiento de biomasa y de consumo de sustrato a partir de un conjunto de datos experimentales de las concentraciones de biomasa y de sustrato en función del tiempo en un cultivo Batch.

Los valores de los parámetros μ_{MAX} y K_S son obtenidos a partir de las relaciones lineales deducidas de la ecuación de Monod, conociendo primeramente los valores de la velocidad de crecimiento de biomasa r_x y de la velocidad de consumo de sustrato r_s :

$$\mu = \mu_M \frac{S}{K_S + S}$$

La anterior ecuación debe ser convertida en un modelo lineal, por lo que se desglosa las siguientes ecuaciones:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{MAX}} + \frac{K_S}{\mu_{MAX}} \cdot \frac{1}{S} \qquad \frac{S}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{MAX}} + \frac{1}{\mu_{MAX}} \cdot S$$

Considerando que los microorganismos se comportan de acuerdo con el modelo de Monod, la representación gráfica de S/μ versus S y $1/\mu$ versus $1/S$ corresponden a una línea recta, cuyo intercepto es: K_S/μ_{MAX} ; $1/\mu_{MAX}$ y la pendiente es: $1/\mu_{MAX}$; K_S1/μ_{MAX} respectivamente.

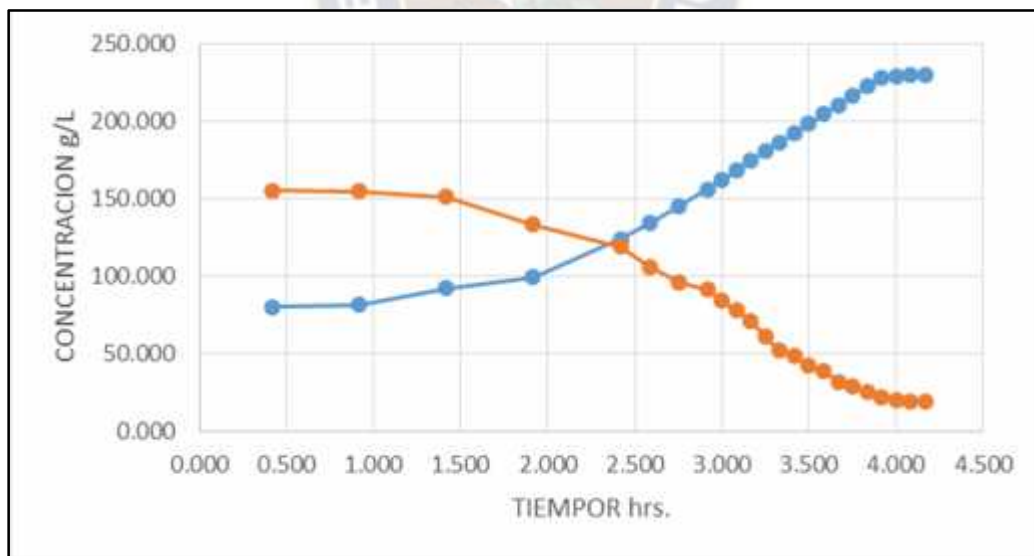
Para el desarrollo de este análisis se tiene los siguientes datos:

Tabla N°5-1: Producción de biomasa y consumo de sustrato

TIEMPO		BIOMASA	SUSTRATO
minutos	Horas	g/L	g/L
25	0.417	80.130	154.96
55	0.917	81.410	154.54
85	1.417	92.110	151.00
115	1.917	99.320	133.00
145	2.417	123.860	119.00
155	2.583	133.820	106.00
165	2.750	144.790	96.00
175	2.917	155.930	91.00
180	3.000	161.750	84.00

185	3.083	167.910	78.00
190	3.167	174.090	71.00
195	3.250	180.230	61.00
200	3.333	186.110	52.00
205	3.417	192.220	49.00
210	3.500	198.330	42.00
215	3.583	204.410	39.00
220	3.667	210.390	32.00
225	3.750	216.560	29.00
230	3.833	222.440	25.00
235	3.917	228.360	22.00
240	4.000	228.680	20.00
245	4.083	229.430	19.00
250	4.167	229.950	19.00

Gráfica N°5-7. Concentración Biomasa - Sustrato vs tiempo



Fuente: Elaboración propia, 2019

La concentración del sustrato se mide con el Lactómetro con unidad de media: gramos disueltos / gramos de solución, para nuestro cálculo se multiplica por el promedio de la densidad de la leche (1.028 g/cc) y del yogurt (1.042 g/cc) para obtener g/L.

Para la obtención de los parámetros cinéticos, los datos obtenidos deben ser expresados de forma diferencial similar a la ecuación inicial.

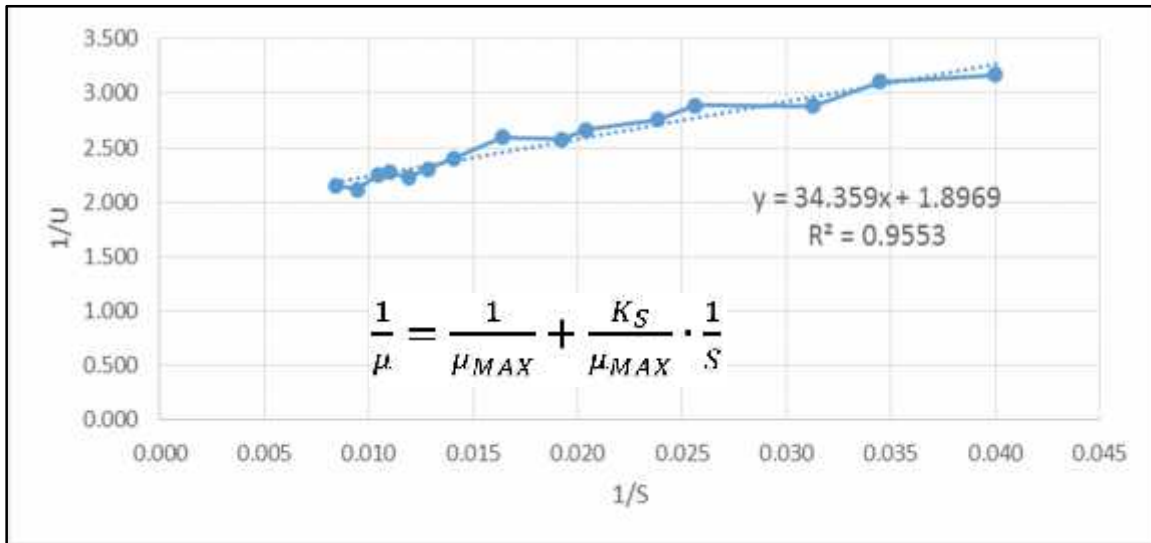
$$\frac{d}{d} = \mu \cdot B$$

Tabla N°5-2: Cálculos realizados para la obtención de coeficientes cinéticos.

$\frac{B_2 - B_1}{t_2 - t_1}$	$\frac{S_2 + S_1}{2}$	$1/S$	$\frac{B_2 + B_1}{2}$	U	1/u	s/u
d / d	S	$1/S$	B	U	1/u	s/u
2.560	154.000	0.006	80.770	0.032	31.551	4882.546
21.400	152.000	0.006	86.760	0.247	4.054	619.369
14.420	142.000	0.007	95.715	0.151	6.638	942.547
49.080	126.000	0.008	111.590	0.440	2.274	286.478
59.760	112.500	0.008	128.840	0.464	2.156	242.545
65.820	101.000	0.009	139.305	0.472	2.116	213.762
66.840	93.500	0.010	150.360	0.445	2.250	210.333
69.840	87.500	0.011	158.840	0.440	2.274	199.005
73.920	81.000	0.012	164.830	0.448	2.230	180.617
74.160	74.500	0.013	171.000	0.434	2.306	171.784
73.680	66.000	0.014	177.160	0.416	2.404	158.694
70.560	56.500	0.016	183.170	0.385	2.596	146.671
73.320	50.500	0.019	189.165	0.388	2.580	130.290
73.320	45.500	0.020	195.275	0.375	2.663	121.181
72.960	40.500	0.024	201.370	0.362	2.760	111.780
71.760	35.500	0.026	207.400	0.346	2.890	102.602
74.040	30.500	0.031	213.475	0.347	2.883	87.939
70.560	27.000	0.034	219.500	0.321	3.111	83.992
71.040	23.500	0.040	225.400	0.315	3.173	74.562
3.840	21.000	0.045	228.520	0.017	59.510	1249.719
9.000	19.500	0.050	229.055	0.039	25.451	496.286
6.240	19.000	0.053	229.690	0.027	36.809	699.377

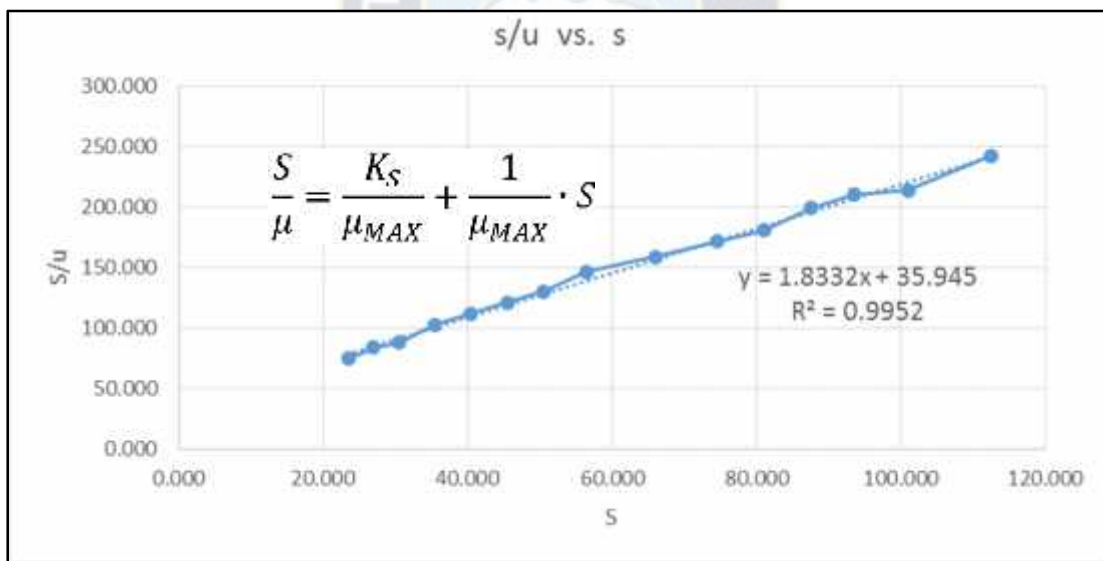
Fuente: Elaboración propia, 2019

Gráfica N°5-8: 1/u vs 1/S



Fuente: Elaboración propia, 2019

Gráfica N°5-9: S/u vs S



Fuente: Elaboración propia, 2019

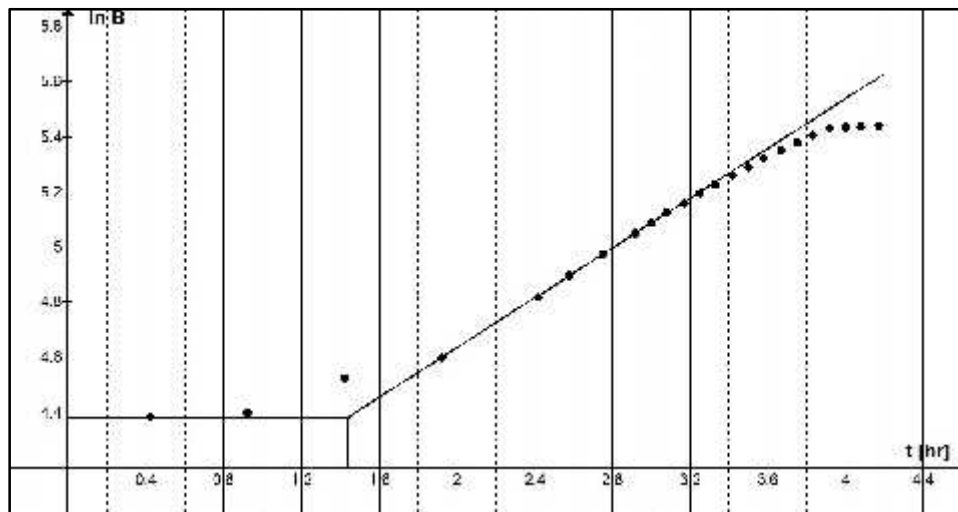
Comparando las ecuaciones en cada gráfica podemos determinar las constantes μ_{MAX} y K_S :

$$\frac{1}{\mu_M} = 1.8332 \quad \frac{1}{\mu_M} = 1.8969 \quad \mu_{MAX} = 0.536 \text{ [1/hr]}$$

$$\frac{K_S}{\mu_M} = 35.495 \quad \frac{K_S}{\mu_M} = 34.359 \quad K_S = 18.73 \text{ [g/L]}$$

El tiempo de latencia podemos determinar gráficamente:

Gráfica N°5-10: Ln B vs Tiempo



Fuente: Elaboración propia, 2019

El tiempo de latencia es $t_L = 1.44$ hr.

5.3. Desarrollo del Sistema Batch

El modelo matemático general del proceso es obtenido mediante el balance de materia en el Quimiostato, una forma general de este concepto es la ley de conservación de la masa.

$$\text{Flujo másico de acumulación} = \text{Flujo másico de ingreso} - \text{Flujo másico de salida} + \text{Flujo másico de formación} - \text{Flujo másico de consumo}$$

Aplicando el balance de masa y por las características del sistema Batch, se discriminan los términos de Ingreso y Salida de material, quedando la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Flujo másico de acumulación} &= \text{Flujo másico de formación} - \text{Flujo másico de consumo} \\ r_{Ax} &= r_{Fx} - r_{Cx} \end{aligned} \quad (\text{ec-5.1})$$

Análisis para la Concentración de Biomasa "B"

1ra Fase.- No existe división celular pero sí aumento de la masa individual de los microorganismos por la alimentación de los nutrientes del sustrato (fase "lag" o fase de retardo), el flujo de formación de la biomasa "B" está descrito por la siguiente ecuación.

$$r_{FB} = \mu B \quad (\text{ec-5.2})$$

Considerando la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \quad (\text{ec-5.3})$$

Relacionando la ecuación (2) y (3)

$$r_{FB} = \mu_m \frac{S}{K_S + S} B \quad (\text{ec-5.4})$$

En esta primera fase no existe consumo de Biomasa "B", por lo tanto el flujo de consumo es nulo.

$$r_{CB} = 0 \quad (\text{ec-5.5})$$

Al principio del cultivo todos los nutrientes estarán en exceso, la concentración del Sustrato "S" es mayor que la constante de saturación ($S \gg K_S$), bajo esta consideración reemplazamos la ecuación (4) y la (5) en la ecuación (1):

$$r_{AB} = \mu_m B - 0 \quad ; \quad \text{o bien} \quad ; \quad \frac{dB}{dt} = \mu_m B \quad (\text{ec-5.6})$$

Integrando la ecuación (6) con el límite inicial $t = 0$; $B = B_0$ (concentración inicial de microorganismos):

$$\ln B = \ln B_0 + \mu_m t \quad (\text{ec-5.7})$$

La ecuación (7) puede escribirse de la siguiente manera:

$$B = B_0 e^{\mu_m t} \quad (\text{ec-5.8})$$

Con la ecuación (8) se puede determinar la concentración de la biomasa directamente.

2da Fase.- Crecimiento a velocidad específica (μ) máxima y constante $\mu = \mu_m$ (fase exponencial) alcanzando una máxima concentración microbiana. A partir de la ecuación (ec.7) se puede calcular el tiempo de generación del microorganismo (t_G = período de tiempo en que se producirá la misma cantidad que se ha añadido).

$$B = 2 B_0 \quad ; \quad 2B_0 = B_0 e^{\mu_m t_G} \quad ; \quad t_G = \frac{\ln 2}{\mu_m} \quad (\text{ec-5.9})$$

3ra Fase.- Período de desaceleración donde $\mu \rightarrow 0$ y se entra en la fase estacionaria la cual es causada por agotamiento de algún nutriente (el sustrato limitante) ocasionando una concentración microbiana constante.

$$S \rightarrow 0 \quad ; \quad r_{FB} \rightarrow 0 \quad ; \quad \text{en la ecuación (1):}$$

$$r_{AB} = 0 - 0$$

4ta Fase.- Disminución de la concentración de biomasa por autólisis (proceso biológico por el cual una célula se autodestruye debido a la actividad de proteínas líticas, lisis= perdida, dilución) es una fase de decaimiento.

$$S = 0 \quad ; \quad r_{FB} = 0 \quad ; \quad B = B_f = \text{cte}$$

Análisis del Consumo de Sustrato “S”

$$\text{Flujo másico de acumulación} = \text{Flujo másico de formación} - \text{Flujo másico de consumo} \quad (\text{ec-5.11})$$

$$r_{AS} = r_{FS} - r_{CS}$$

El rendimiento se define como
$$Y_{B/S} = -\frac{dB}{dS} = \frac{dB/dt}{-dS/dt} = \frac{r_{FB}}{r_{CS}}$$

Por tanto:
$$r_{CS} = \frac{r_{FB}}{Y_{B/S}} \quad (\text{ec-5.12})$$

Reemplazando la ecuación (12) y la ecuación (4) en la ecuación (11) queda:

$$r_{AS} = 0 - \frac{1}{Y_{B/S}} \left(\mu_m \frac{S}{k_S + S} B \right) \quad (\text{ec-5.13})$$

A medida que la concentración del sustrato “S” tiende a cero $r_{AS} = 0$.

En fase exponencial será $S \gg k_s$ y además B estará dado por la ecuación (8), por tanto la ecuación (13) se expresa como:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_m B_0 e^{\mu_m t}}{Y_{B/S}} \quad (\text{ec-5.14})$$

Integrando la ecuación (14) con el límite inicial $t = 0$; $S = S_0$ (concentración inicial del sustrato):

$$S = S_0 - \frac{B_0}{Y_{B/S}} \left(e^{\mu_m t} - 1 \right) \quad (\text{ec-5.15})$$

La ecuación (15) da la variación de la concentración del sustrato “S” en función del tiempo “t” durante la fase exponencial.

Si se conoce de antemano el rendimiento ($Y_{B/S}$) y las concentraciones iniciales de sustrato y biomasa, es fácil estimar el valor de B_f ya que:

$$\Delta B = -Y_{B/S} \Delta S \quad (\text{ec-5.16})$$

$$B - B_0 = -Y_{B/S} (S - S_0) \quad (\text{ec-5.17})$$

Si S es el sustrato limitante, se tendrá que para $B = B_f$ será $S_f = 0$, por tanto:

$$B_f = B_0 + Y_{B/S} S_0 \quad (\text{ec-5.18})$$

Alternativamente la ecuación (17) puede emplearse para verificar si se cumple que la gráfica de $(B_f - B_0)$ en función de $(S_0 - S)$ se ajusta a una recta. De todos modos siempre es posible calcular un rendimiento global, independientemente de las variaciones que pueda tener durante el cultivo, empleando sólo valores iniciales y finales:

$$Y_{B/S} = - \frac{(B_f - B_0)}{(S_f - S_0)} \quad (\text{ec-5.19})$$

5.4. Desarrollo del Sistema Feed Batch

Si el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento, esta técnica permite controlar la velocidad de crecimiento (μ) del microorganismo.

El cultivo semicontinuo se inicia a partir de un cultivo en Batch, por lo que las condiciones iniciales para este sistema (V_0, X_0, S_0) son las condiciones finales del Batch.

Por las características del sistema existe Ingreso pero no Salida de material, por lo tanto se discriminan esos términos, quedando la siguiente ecuación:

$$\begin{array}{l} \text{Flujo másico de} \\ \text{acumulación} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Flujo másico} \\ \text{de Ingreso} \end{array} + \begin{array}{l} \text{Flujo másico} \\ \text{de formación} \end{array} - \begin{array}{l} \text{Flujo másico} \\ \text{de consumo} \end{array} \quad (\text{ec-5.20})$$

$$r_{Ax} = Q_{Ix} + r_{Fx} - r_{Cx}$$

Análisis para la concentración de Sustrato "S" $X=S$,

$$\frac{d(S \cdot V)}{d t} = F S_R + 0 - \frac{\mu B V}{Y_{B/S}} \quad (\text{ec-5.21})$$

S_R = concentración del sustrato en el reservorio

En este caso el volumen no es constante:

$$V \frac{dS}{dt} + S \frac{dV}{dt} = FS_R - \frac{\mu B V}{Y_{B/S}} \quad (\text{ec-5.22})$$

La condición final del batch es $S = 0$, pues, como se intenta controlar μ , S no puede ser saturante.

Si $S \sim 0$, $dS/dt = 0$, con lo que la ecuación (22) se transforma en:

$$0 = FS_R - \frac{\mu B V}{Y_{B/S}} \quad (\text{ec5.23})$$

Recordando que $r_{FB} = \mu B$

$$FS_R = \frac{r_{FB} V}{Y_{B/S}} \quad (\text{ec-5.24})$$

La anterior ecuación indica que la velocidad de producción de biomasa se acomoda a la velocidad de suministro de sustrato, es decir que r_{FB} puede controlarse "externamente", modificando el flujo "F" y/o la concentración "S_R".

La ecuación (23) es en realidad un límite superior ya que dados μ , B y V , cualquier par de valores F , S_r que satisfagan la condición

$$FS_R \leq \frac{\mu B V}{Y_{B/S}} \quad (\text{ec-5.25})$$

Harán que la velocidad de crecimiento esté limitada por la velocidad de alimentación. Esta ecuación (23) será muy útil en el momento de diseñar la alimentación.

Análisis para la Concentración de Biomasa "B":

Flujo másico de acumulación	de	=	Flujo másico de Ingreso	+	Flujo másico de formación	-	Flujo másico de consumo
r_{Ax}		=	Q_{Ix}	+	r_{Fx}	-	r_{Cx}

$$\frac{d(BV)}{dt} = 0 + r_{FB} V - 0 \quad (\text{ec-5.26})$$

$$\frac{1}{V} \frac{d(BV)}{dt} = r_{FB} \quad (\text{ec-5.27})$$

Reemplazando en (24):
$$FS_R = \frac{1}{Y_{B/S}} \frac{d(BV)}{dt} \quad (\text{ec-5.28})$$

Lo que indica que la velocidad de acumulación de biomasa depende de la velocidad de alimentación de sustrato.

Integrando la ecuación (28), se tiene:

$$BV = B_0 V_0 + Y_{B/S} F S_R t \quad (\text{ec-5.29})$$

En Batch Alimentado el Volumen no es constante, sino que varía con el tiempo ($F = dV/dt$).

Integrando se tiene:

$$V = V_0 + F t \quad (\text{ec-5.30})$$

Reemplazando en (29) y despejando B, se tendrá:

$$B = \frac{B_0 V_0 + Y_{B/S} F S_R t}{Ft + V_0} \quad (\text{ec-5.31})$$

Expresión que describe la variación de la Biomasa con el tiempo a lo largo del cultivo alimentado.

5.5. Desarrollo del Sistema Continuo

Para poner en marcha un cultivo continuo, se realiza previamente un cultivo batch y en un momento dado se comienza a alimentar con medio fresco a un caudal F y por un rebalse se mantiene el volumen constante, aplicando la ley de conservación de la masa.

Flujo másico de acumulación	=	Flujo másico de ingreso	-	Flujo másico de salida	+	Flujo másico de formación	-	Flujo másico de consumo
r_{Ax}	=	Q_{Ix}	-	Q_{Sx}	+	r_{Fx}	-	r_{Cx}

Análisis para la Concentración de Biomasa "B":

$$\frac{dVB}{dt} = 0 - F \cdot B + V \cdot r_{FB} - 0$$

$$V \frac{dB}{dt} = -F \cdot B + V \cdot r_{FB} \quad (\text{ec-5.32})$$

Análisis para la Concentración de Sustrato "S":

$$\frac{dVS}{dt} = F \cdot S_R - F \cdot S + 0 - V \cdot r_{CS}$$

$$V \frac{dS}{dt} = F(S_R - S) - V \cdot r_{CS} \quad (\text{ec-5.33})$$

Considerando que alcanzado el sistema de cultivo continuo se llegue a un estado estacionario, las ecuaciones son las siguientes:

$$\begin{aligned} \text{De la ecuación 32:} \quad 0 &= -F \cdot B + V \cdot r_{FB} \quad ; \quad r_{FB} = \mu \cdot B \\ F \cdot B &= V \cdot \mu \cdot B \quad ; \quad \mu = \frac{F}{V} = D \end{aligned}$$

Donde: D = Tasa de dilución.

Introduciendo la ecuación de Monod:

$$\mu = D = \mu_{MAX} \frac{S}{K_S + S} \quad ; \quad S = \frac{D \cdot K_S}{\mu_{MAX} - D} \quad (\text{ec-5.34})$$

De la ecuación 33:

$$0 = F(S_R - S) - V \cdot r_{CS} \quad ; \quad r_{CS} = D \cdot (S_R - S)$$

Considerando que:

$$Y_{B/S} = \frac{r_{FB}}{r_{CS}} = \frac{D \cdot B}{D \cdot (S_R - S)} \quad ; \quad B = Y_{B/S} \cdot (S_R - S)$$

La variación de la biomasa es:

$$B = Y_{B/S} \left(S_R - \frac{D \cdot K_S}{\mu_{MAX} - D} \right) \quad (\text{ec-5.35})$$

5.6. Modelos matemáticos a partir de los datos experimentales

Parámetros iniciales:

$$\begin{aligned} B_0 &= 80.1 \text{ [g/L]} & S_R &= 154 \text{ [g/L]} & S_0 &= 154 \text{ [g/L]} \\ V_0 &= 2.0 \text{ [L]} & V_F &= 5.0 \text{ [L]} & F &= 1.02 \text{ [L/h]} \end{aligned}$$

El tiempo de Latencia obtenido del grafico es: $t_L = 1.44 \text{ [hr]}$

Para los modelos obtenidos se debe considerar los coeficientes cinéticos obtenidos anteriormente.

$$\mu_{MAX} = 0.536 \text{ [1/hr]} \quad ; \quad K_S = 18.73 \text{ [g/L]}$$

Rendimiento:

$$Y_{B/S} = -\frac{(B_f - B_o)}{(S_f - S_o)} = 1.84 \text{ (VALOR PROMEDIO)} \quad ; \quad D = 0.45 \text{ [1/hr]} \text{ (INICIALMENTE, LUEGO VARIA)}$$

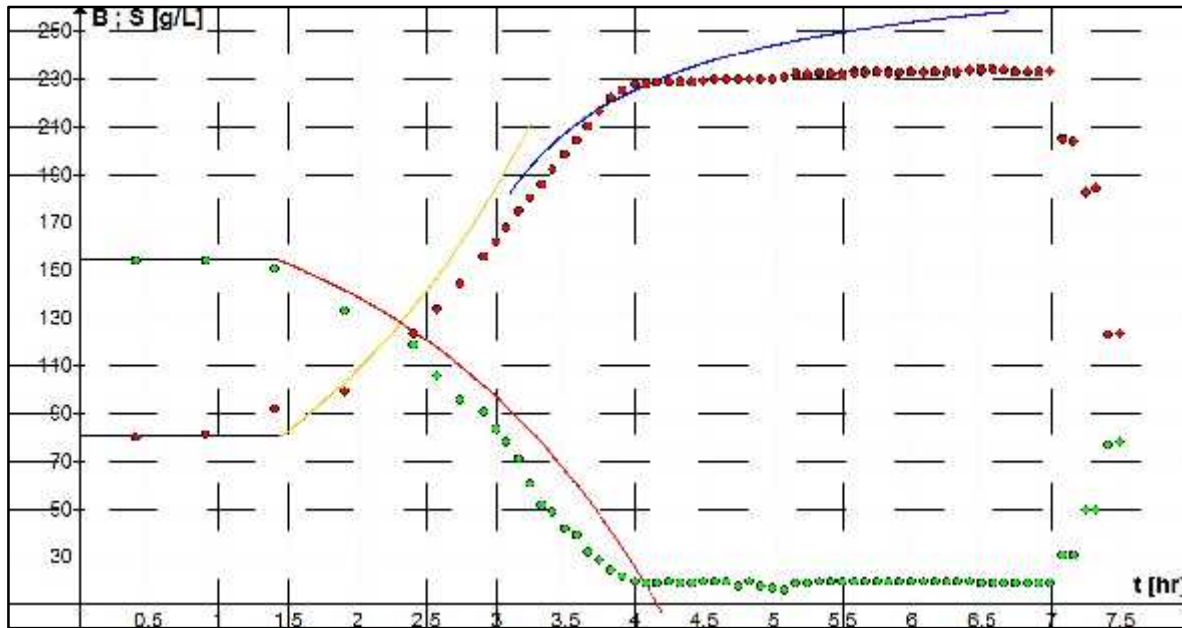
Tabla N°5-3: Ecuación y modelos matemáticos

	COMPONENTE	ECUACION Y MODELO	INTERVALO DE TIEMPO
SISTEMA BATCH	Biomasa:	$B = B_o e^{\mu_m t - t_L}$ $B = 80.1 e^{0.536 t - 0.772}$	1.44 – 3.85 hrs.
	Sustrato:	$S = S_o - \frac{B_o}{Y_{B/S}} \left(e^{\mu_m t - t_L} - 1 \right)$ $S = 197.53 - 43.53 \cdot e^{0.536(t - 1.44)}$	
SISTEMA FEED-BATCH	Biomasa:	$B = \frac{B_o V_o + Y_{B/S} F S_R t}{Ft + V_o} \quad ; \quad B_o = 221 \text{ [g/L]}$	3.85 – 6.75 hrs.
	Sustrato:	$B = \frac{442 + 289 (t - 3.85)}{1.02 (t - 3.85) + 2}$ $S \sim 0, dS/dt = 0$	
SISTEMA CONTINUO	Biomasa:	$B = Y_{B/S} \left(S_R - \frac{D \cdot K_S}{MAX - D} \right)$ $B = 283.36 - \frac{D \cdot 34.46}{0.536 - D}$	6.75 – 7.5 hrs.
	Sustrato:	$S = \frac{D \cdot K_S}{MAX - D} \quad ; \quad S = \frac{D \cdot 18.73}{0.536 - D}$ <p>Sistema estacionario,</p>	

5.7. Representación gráfica de los modelos matemáticos y los datos experimentales.

A continuación se muestra la relación entre el análisis teórico con los datos experimentales.

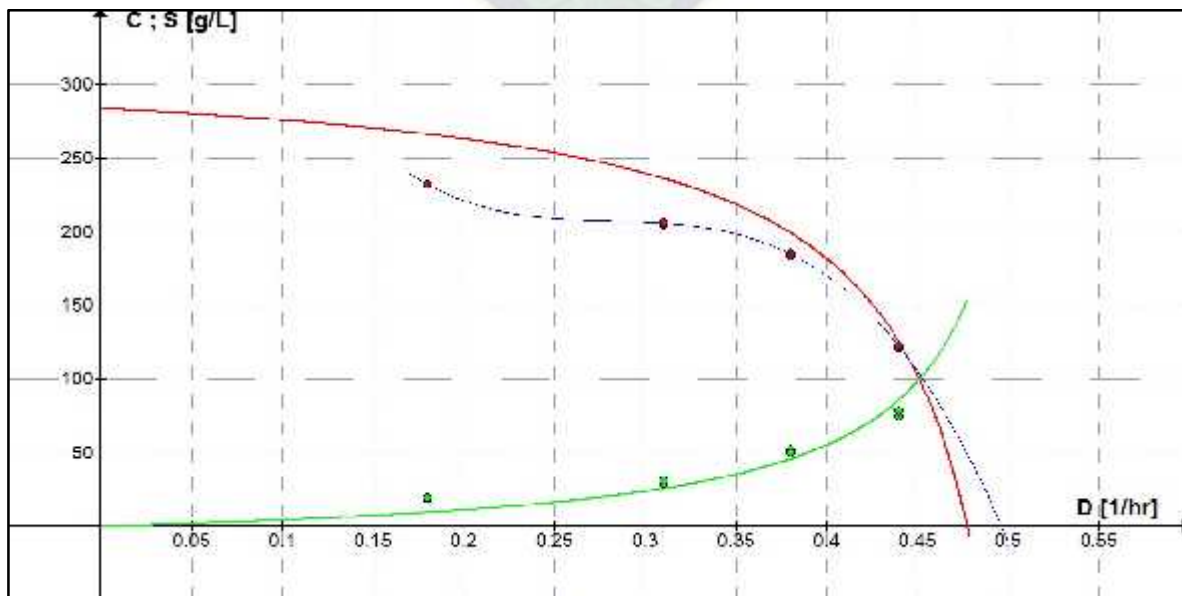
Gráfica N°5-11. Biomasa-Sustrato vs Tiempo



Fuente: Elaboración propia, 2019

Los modelos obtenidos tienen una bastante aproximación con los datos experimentales, los últimos datos se obtuvieron variando la dilución, su relación es la siguiente:

Gráfica N°5-12. Biomasa-Sustrato vs Dilución



Fuente: Elaboración propia, 2019

En esta última gráfica se observa como varia la concentración de la biomasa y del sustrato a diferentes diluciones, este grafica sirve para determinar la tasas de dilución critica del sistema, según como se observa, el sistema de estudio tiene una tasa de dilución critica teórica de $D=0.475$ [1/hr] y experimental $D=0.495$ [1/hr].



CAPITULO 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIÓN GENERAL

Se elaboró modelos matemáticos para la producción de biomasa en los sistemas: Cultivo Batch, Cultivo Feed Batch y Cultivo Continuo por medio de un balance de masa, los cuales fueron validados experimentalmente a través de un prototipo de Quimiostato, adquiriendo datos de las variables del sistema a través de micro-controladores.

6.2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

Se identificó que los micro-controladores necesarios para el funcionamiento del prototipo de Quimiostato son: sensor de temperatura, sensor de flujo, sensor de PH, sensor de turbidez, sensor de nivel, módulo Relay y resistencia de 10Kohm, los cuales posibilitan el mejor control y la adquisición de datos necesarios para el control de los procesos dentro del sistema de estudio.

Con la información recabada, se construye un prototipo semejante al Quimiostato con un volumen de control de hasta cinco litros y con micro-controladores para la adquisición de datos de las variables de operación. Concluida la construcción del prototipo, se procede a la puesta en marcha del prototipo en el cual se utiliza agua para operar dentro del sistema (prueba en blanco) e identificar posibles fallas que se deben subsanar.

Se obtuvieron los siguientes modelos matemáticos para los tres sistemas de estudio:

	COMPONENTE	ECUACION Y MODELO	INTERVALO DE TIEMPO
SISTEMA BATCH	Biomasa: Sustrato:	$B = 80.1 e^{0.536 t - 0.772}$ $S = 197.53 - 43.53 \cdot e^{0.536(t - 1.44)}$	1.44 – 3.85 hrs.
SISTEMA FEED-BATCH	Biomasa: Sustrato:	$B = \frac{442 + 289(t - 3.85)}{1.02(t - 3.85) + 2}$ $S \sim 0, dS/dt = 0$	3.85 – 6.75 hrs.

SISTEMA CONTINUO	Biomasa:	$B = 283.36 - \frac{D \cdot 34.46}{0.536 - D}$	6.75 – 7.5
	Sustrato:	$S = \frac{D \cdot 18.73}{0.536 - D}$	hrs.

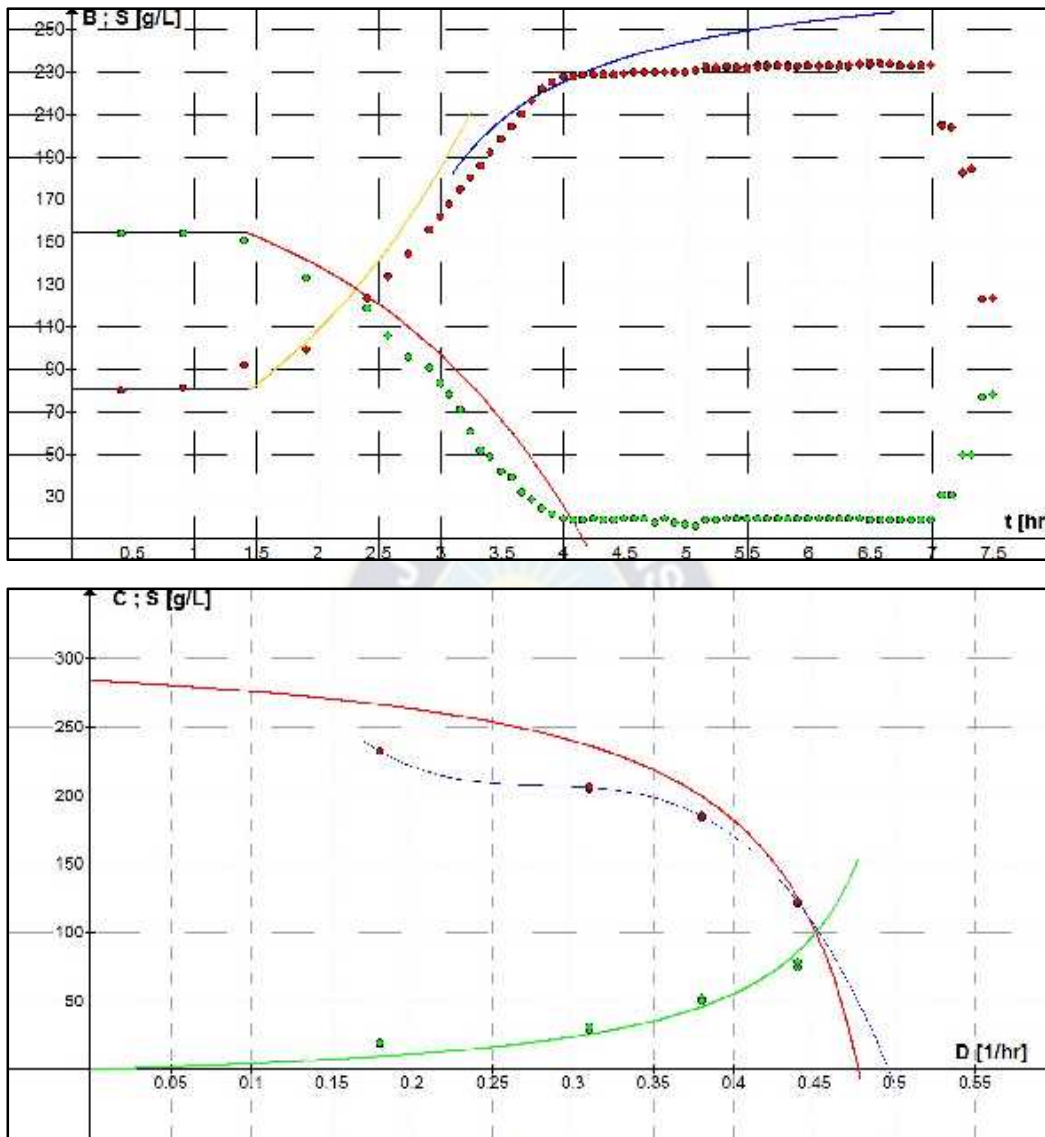
Sistema Batch.- Se observa que la concentración de la Biomasa y del sustrato varia de forma exponencial hasta el punto en que se agota la concentración del sustrato, a partir de ahí, el crecimiento microbiano es estable y transcurrirá un cierto tiempo para que los microorganismos mueran.

Sistema Feed Batch.- Las condiciones finales del sistema Batch se convierten en las condiciones iniciales de este sistema, antes que la concentración del sustrato se acabe por completo se añade un flujo constante de sustrato enriquecido, el cual aumenta posibilidad del tiempo de vida de los microorganismos hasta llegar a un volumen de 5L según el prototipo construido. La concentración del sustrato permanece constante en esta etapa con una tendencia a agotarse siempre y cuando el flujo de alimentación permanezca constante.

Sistema Cultivo continuo.- Las condiciones del anterior sistema se convierten en las condiciones iniciales de este, este sistema permite obtener biomasa de forma continua a diferentes concentraciones dependiendo del flujo de alimentación del sustrato. Este sistema tiene una alta importancia puesto que permite apreciar los cambios que sufre la biomasa ante varias modificaciones en sus variables de operación, aunque resulta costoso por la constante adición de medio de cultivo.

Se desarrolló un diseño experimental 3^2 tomando como factores la temperatura y el porcentaje de adición de cultivo con tres niveles de prueba cada uno, con la finalidad de corroborar el valor bibliográfico en cuanto a la adición de cultivo, concluyendo que el porcentaje de adición 3-5% es el suficiente para obtener rendimientos aceptables de producción, menor al 3% incrementa el tiempo de producción, mayor al 5% incurre en sobregasto de cultivo con un rendimiento similar.

Con los modelos matemáticos elaborados y los datos experimentales obtenidos, se obtiene la gráfica de cultivo continuo en el cual se observa la variación de la concentración máxima a la tasa de dilución de 0.47 [1/hr].



6.2. RECOMENDACIONES

Se recomienda usar la información de este proyecto como base para la construcción de prototipos y elaboración de modelos matemáticos, que puedan ser validados con los datos obtenidos por los micro-controladores.

Se recomienda que la obtención de toma de datos sea en intervalos menores de tiempo para una mayor apreciación de los fenómenos producidos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Shuichi Aiba - Biochemical Engineering. Univ. Tokio Press.Japon-1973
- [2] Senez A. - Microbiología general. Ed. Alhambra. México – 1976
- [3] Brock Thomas – Microbiología. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana México - 1993
- [4] Brovrn T, Campbell I, - Introducción a la biotecnología. Ed. Acribia S,A.España – 1989
- [5] Calcott Peter - Continuous Cultures of Cells CRC Press. Inc- Florida – 1981
- [6] García M.- Quintero R - Lopez A. - Biotecnología alimentaria. Ed. Lirnusa. Mexico – 1993
- [7] Harper Harold - Manual de química fisiológica Ed. El manual moderno. México – 1978
- [8] Mendo R. Manuel - Medios de cultivo en microbiología. Ed. U.N.M. San Marcos. Perú – 1987
- [9] Palleroni Norberto - Principios Generales de microbiología Ed. O.E.A.USA -1980
- [10] Pelczar and Reid – Microbiology. Ed. Mc Graw-Hill. New York – 1958
- [11] Torrente Artero, Óscar. (2013). *Arduino. Curso práctico de formación*. México D.F.: Alfaomega Grupo Editor, S.A. de C.V.
- [12] Tojeiro Calaza, G. (2014). *Taller de Arduino. Un enfoque práctico para principiantes*. Barcelona. MARCOMBO, S.A.
- [13] Pomares Baeza, Jorge. (2009). *Control por computador. Mannual de Arduino*. Universidad de Alicante. GITE – IEA
- [14] PrescottS.C.y Dunn Microbiología industrial. Ed. A.guilar. Madrid - 1970
- [15] Quintero R. Ingeniería Bioquímica. Ed. Alhambra. Mexico – 1981
- [16] Scragg Alan - Biotecnología para ingenieros Ed. Limusa. México – 1996
- [17] Austin G.T - Manual de procesos químicos en la industria. Ed. McGraw-Hill.Mexico-1988
- [18] Borzani W. - Engenharia Bioquímica Ed. Edgard Blücher Ltda-Brasil-1975

ÍNDICE DE ANEXOS

⇒ ANEXO I:

CODIFICACIÓN DE LOS SENSORES PARA EL FUNCIONAMIENTO DEL QUIMIOSTATO

⇒ ANEXO II:

VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CONTROL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA

⇒ ANEXO III:

PROCEDIMIENTO GRÁFICO DE LA PRUEBA EN BLANCO

⇒ ANEXO IV:

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y EL CULTIVO MADRE

ANEXO I

CODIFICACIÓN DE LOS SENSORES PARA EL FUNCIONAMIENTO DEL QUIMIOSTATO

- CODIFICACIÓN DEL SENSOR DE TEMPERATURA DS18B20

```
sensorTemperatura
#include <OneWire.h>
#include <DallasTemperature.h>

OneWire curWire(3); //Se establece el pin 2 como bus OneWire

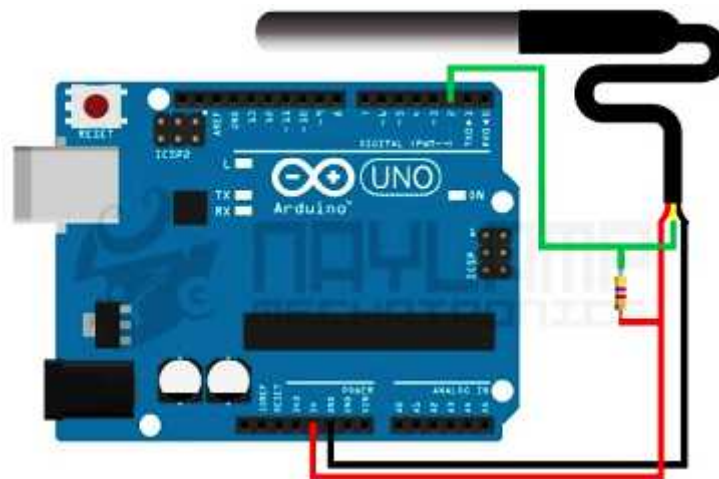
DallasTemperature sensors(&curWire); //Se declara una variable u objeto para nuestro sensor

void setup() {
  // put your setup code here, to run once:
  delay(1000);
  Serial.begin(9600);
  sensors.begin(); //Se inicia el sensor
}

void loop() {
  // put your main code here, to run repeatedly:
  sensors.requestTemperatures(); //Se envia el comando para leer la temperatura
  float temp=sensors.getTempCByIndex(0); //Se obtiene la temperatura en °C

  Serial.print("Temperature- ");
  Serial.print(temp);
  Serial.println("C");
  delay(2000);
}
```

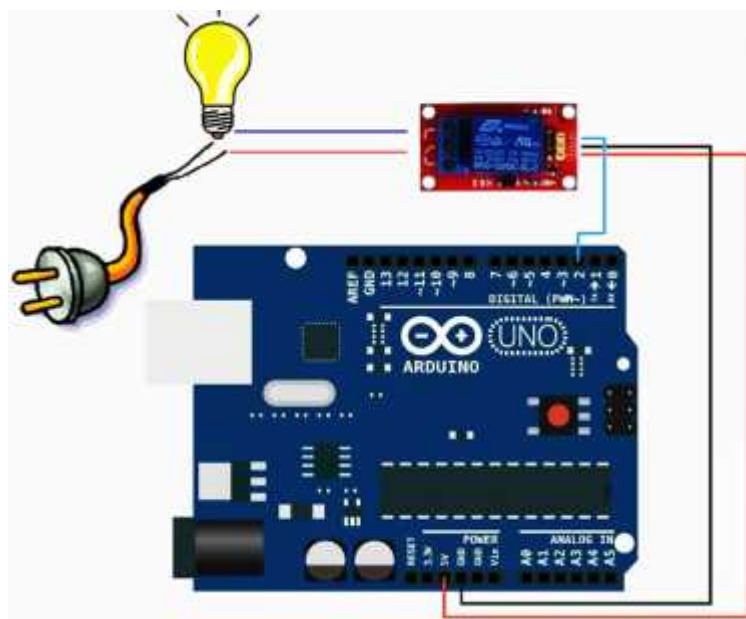
Conectar el sensor como se muestra en la figura:



- CODIFICACIÓN DEL SENSOR DE TEMPERATURA DS18B20 Y RELAY

```
senscrTemperaturaRelay $
#include <OneWire.h>
#include <DallasTemperature.h>
int relay=10;
int setpoint=43.5; //Temperatura a la que se apaga el calentamiento
OneWire ourWire(2); //Se establece el pin 2 como bus OneWire
DallasTemperature sensors(&ourWire); //Se declara una variable C++ objeto para nuestro sensor
void setup() {
  Serial.begin(9600);
  sensors.begin(); //Se inicia el sensor
  pinMode(relay,OUTPUT);
}
void loop() {
  sensors.requestTemperatures(); //Se envia el comando para leer la temperatura
  float temp=sensors.getTempCByIndex(0); //Se obtiene la temperatura en °C
  Serial.print("Temperatura= ");
  Serial.print(temp);
  Serial.println("\n");
  if (temp>=setpoint)
  {
    digitalWrite(relay,LOW);
  }
  else
  {
    digitalWrite(relay,HIGH);
  }
  delay(2000);
}
```

Conectar el sensor como se muestra en la figura:

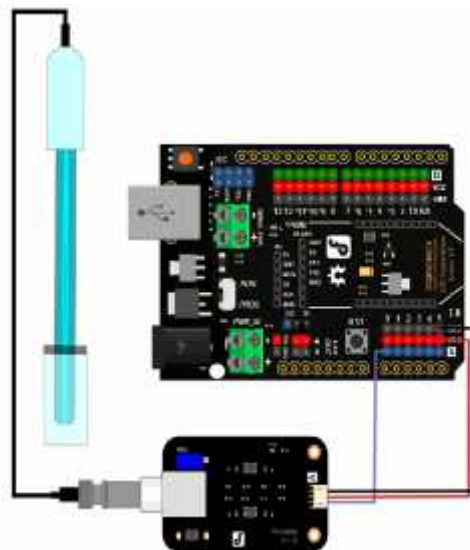


- CODIFICACIÓN DEL SENSOR DE PH

```
const int analogPin = A0; //pin anal de modo in put
double offset = 1.00;
int pin = 13;
int buz[10];
void setup() {
  Serial.begin(9600);
}
void loop() {
  for(int i=0;i<10;i++)
  {
    buz[i] = analogRead(analogPin);
    delay(10);
  }
  int buz[10] = {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0};
  for(int i=0;i<10;i++)
  {
    buz[i] = analogRead(analogPin);
    delay(10);
  }
  Serial.println(buz[0]);
  delay(100);
  buz[0] = buz[1];
  buz[1] = buz[2];
  buz[2] = buz[3];
  buz[3] = buz[4];
  buz[4] = buz[5];
  buz[5] = buz[6];
  buz[6] = buz[7];
  buz[7] = buz[8];
  buz[8] = buz[9];
  buz[9] = buz[0];
}
```

```
int i;
int i=0;
int i++;
int i++;
float pHValue = (analogReadValue - 5) * 0.024 / 5;
//analogReadValue cuando el pH=7 voltaje debe ser 2.5V = (5V/2)
// cuando de un TESIER se mide el voltaje de Pz y GND de modo que con una resistencia de 2.5V y poder conectar la anterior ecuacion
// con un potenciómetro mover el potenciómetro para que este cerca a la salida y con un tester regular a 2.5V en agua
//
float pHValue = 9.4572 * pHVol - 2.9956; //ecuacion obtenida de una recta pE 4.01 -> 9.04V y pH 6.86-6.92. 9.04V obtenemos los voltajes en el pin Pz
Serial.println(" voltaje");
Serial.println(pHVol);
Serial.println(" sensor = ");
Serial.println(pHValue);
delay(2500);
}
```

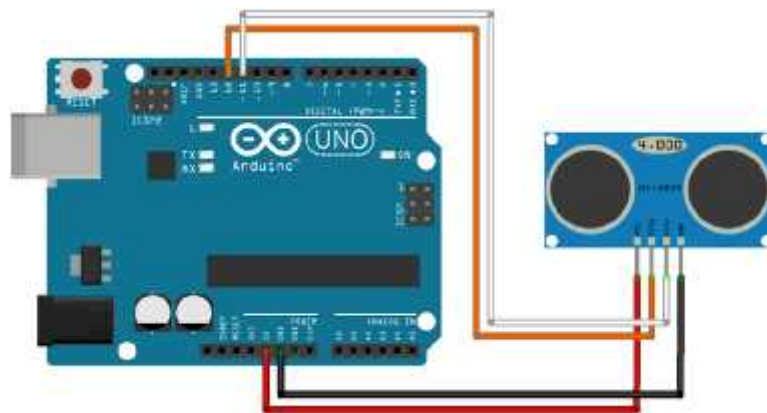
Conectar el sensor como se muestra en la figura:



- CODIFICACIÓN DEL SENSOR DE NIVEL

```
sensor_nivel.ino
// DECLARACION DE VARIABLES PARA PINES
const int pinEcho = 0;
const int pinTrig = 9;
const int pinLed = 13;
// VARIABLES PARA CONSTANTES //unsigned int tiempo; float;
float volumen;
float voltaje=0;
void setup() {
  Serial.begin(9600); // INICIAMOS LA COMUNICACION SERIAL
  pinMode(pinTrig, OUTPUT); // CONFIGURAR PINES DE ENTRADA Y SALIDA
  pinMode(pinLed, OUTPUT);
}
void loop() {
  digitalWrite(pinTrig, LOW); // MANTEN PULSO DE DESPACHO EN EL PIN "TRIGGER"
  delayMicroseconds(2);
  digitalWrite(pinTrig, HIGH);
  delayMicroseconds(10); // EL PULSO DURA AL MENOS 10 uS EN ESTADO ALTO
  digitalWrite(pinLed, LOW);
  voltaje = pulseIn(pinEcho, HIGH); // MEDIR EL TIEMPO EN ESTADO ALTO DEL PIN "ECHO" EL PULSO ES PROPORCIONAL A LA DISTANCIA MEDIDA
  // LA VELOCIDAD DEL SONIDO ES = 340.2m/s = en 1 centimetro es: 29.100 microsegundos (x 2 ida y vuelta 58.200)
  // DIVIDAMOS EL TIEMPO DEL PULSO ENTRE 58, TIEMPO QUE TARDA RECORRER UNA VUELTA UN CENTIMETRO LA OTRA VUELTA
  // ENVIAR EL RESULTADO AL MONITOR SERIAL
  volumen = 0.0692*voltaje*311.0713*voltaje*2.5*0.673*voltaje*3.4056;
  Serial.println(volumen);
  Serial.println(" ");
  delay(3000);
}
```

Conectar el sensor como se muestra en la figura:



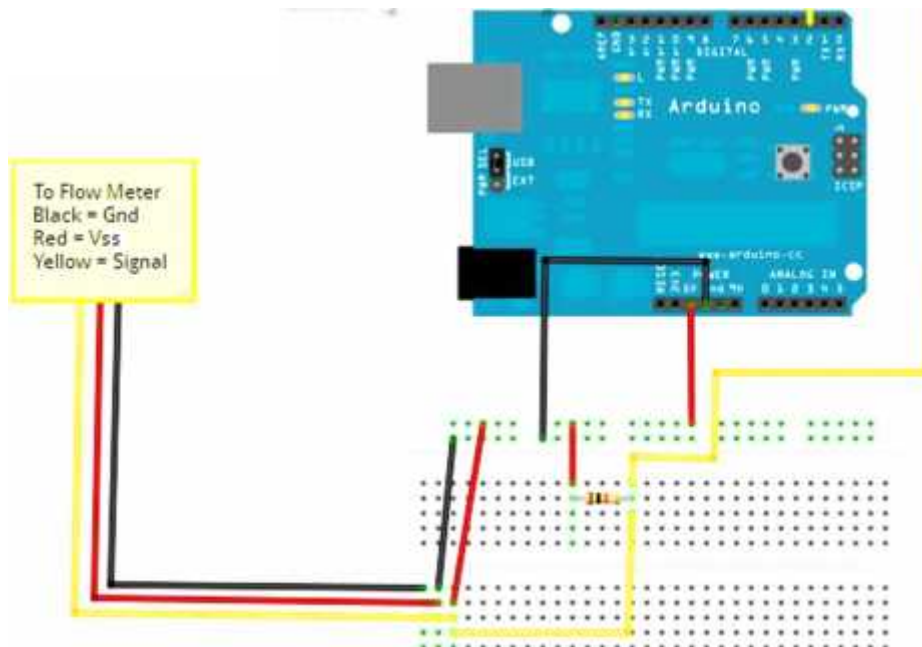
- CODIFICACIÓN DEL SENSOR DE FLUJO**

```
SENSOR_DE_FLUJO

// Lectura del caudal de líquidos usando Seeedstudio y el sensor de flujo de agua en Seeedstudio.com
// Código adaptado por Charles Gantt de IO For RPM código escrito por Cronn @ thehackersacademy.com
// http://thehackersacademy.com http://thehackersacademy.com Http://seeedstudio.com

int NbTopsFen ; // medición de los bordes ascendentes de la señal — frecuencia de pulso
int calc ; // calcula el valor a imprimir
int hallsensor=2; // la ubicación del pin del sensor
void rpm () // Esta es la función que llama a la interrupción
{ NbTopsFen ++ ; // Esta función mide el flanco ascendente y descendente del Señal de sensores de efecto Hall ;
}
void setup () ;
pinMode(hallsensor, INPUT ) ; // inicializa el pin digital 2 como entrada
Serial.begin( 9600 ) ; // Esta es la función de configuración donde se encuentra el puerto serie inicializado,
attachInterrupt( 0 , rpm, RISING ) ; // y la interrupción está conectada
}
void loop () ;
NbTopsFen = 0 ; // Establece NbTops = 0 lista para los cálculos
re [] ; // Reinicia el retraso de interrupciones
delay( 1000 ) ; // Espera 1 segundo
cli [] ; // Deshabilitar interrupciones
calc = ( NbTopsFen * 60 / 7.5 ) ; // (Frecuencia de pulso x 60) / 7.5, = caudal en L / hora
CAUDAL=1.8478*calc-0.6516;// ecuación de cálculo
Serial.println ( CAUDAL, DEC ) ; // Imprime el número calculado anteriormente
Serial.println ( "L / hora" ) ; // Imprime "L / hora" y devuelve una nueva línea
}
```

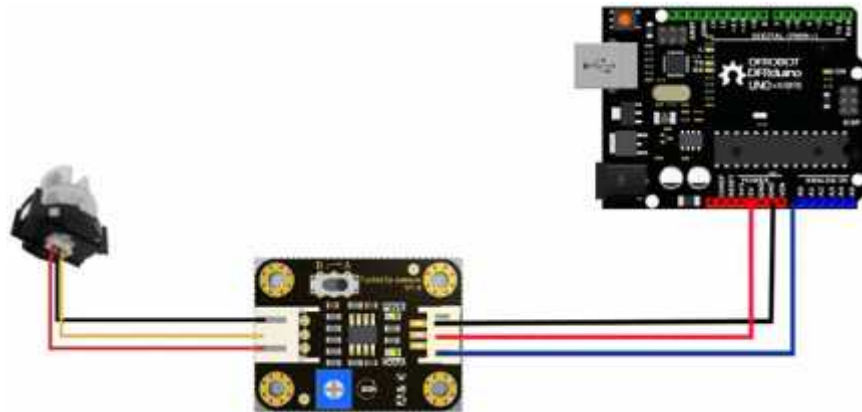
Conectar el sensor como se muestra en la figura:



- CODIFICACIÓN DEL SENSOR DE TURBIDEZ

```
sensor_de_turbidez$
const Concentracion;
void setup() {
  Serial.begin(9600); //Baud rate: 9600
}
void loop() {
  int sensorValue = analogRead(A0); // read the input on analog pin 0:
  float voltage = sensorValue * (5.0 / 1024.0); // Convert the analog reading (which goes from 0 - 1023) to a voltage (0 - 5V):
  Concentracion= 1.1583*v-2  5.0775*v-4.891;
  Serial.println(voltage); // print out the value you read:
  Serial.println(Concentracion);
  delay(2000);
}
```

Conectar el sensor como se muestra en la figura:



- CODIFICACIÓN DEL SISTEMA QUIMIOSTATO

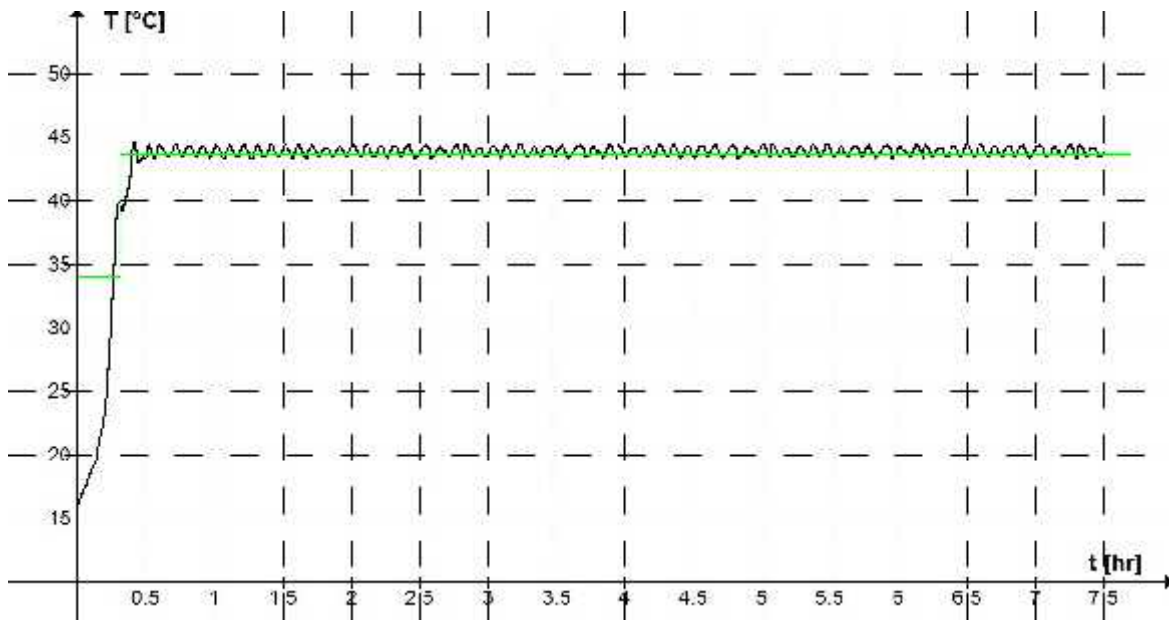
```
#include <Arduino.h>
int tiempoCosecha= 3000;
//=====
#include <Wire.h>
#include <DallasTemperature.h>
//=====
int serpoint=4;
//Se establece el pin 4 como bus OnOff
//Se establece las variables para mostrar sensores
//=====
//variable para la cantidad de pulsos recibidos
int Pulsos= 0; //Se establece en el pin 2
float factor_conversion=7.5; //para convertir de frecuencia a caudal

//=====
void ContarPulsos ()
{
  while(1); //funcionamiento de control de pulsos
// Función para obtener frecuencia de los pulsos
float obtenerFrecuencia()
{
  // Función para
  while(1); //funcionamiento de control de pulsos
  interrupt(); //Desactivamos las interrupciones
  digitalWrite(serpoint, HIGH); //encendido
  digitalWrite(serpoint, LOW); //Desactivamos las interrupciones
  frecuencia=BusPulsos; //En(pulsos por segundo)
}
```

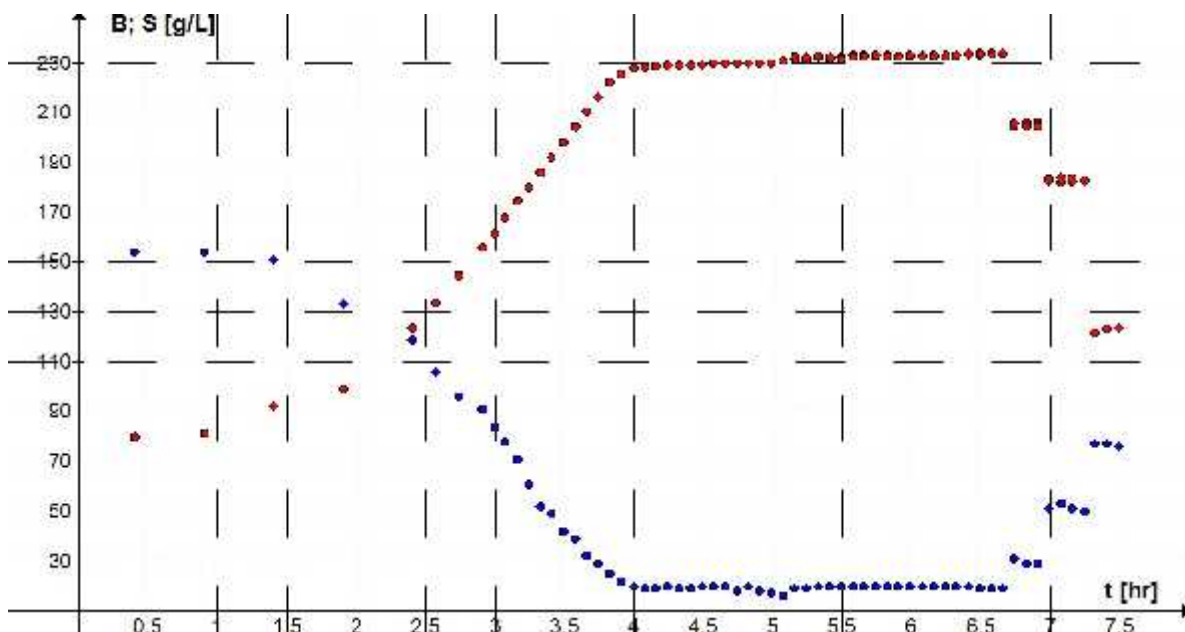

ANEXO II

VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CONTROL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA

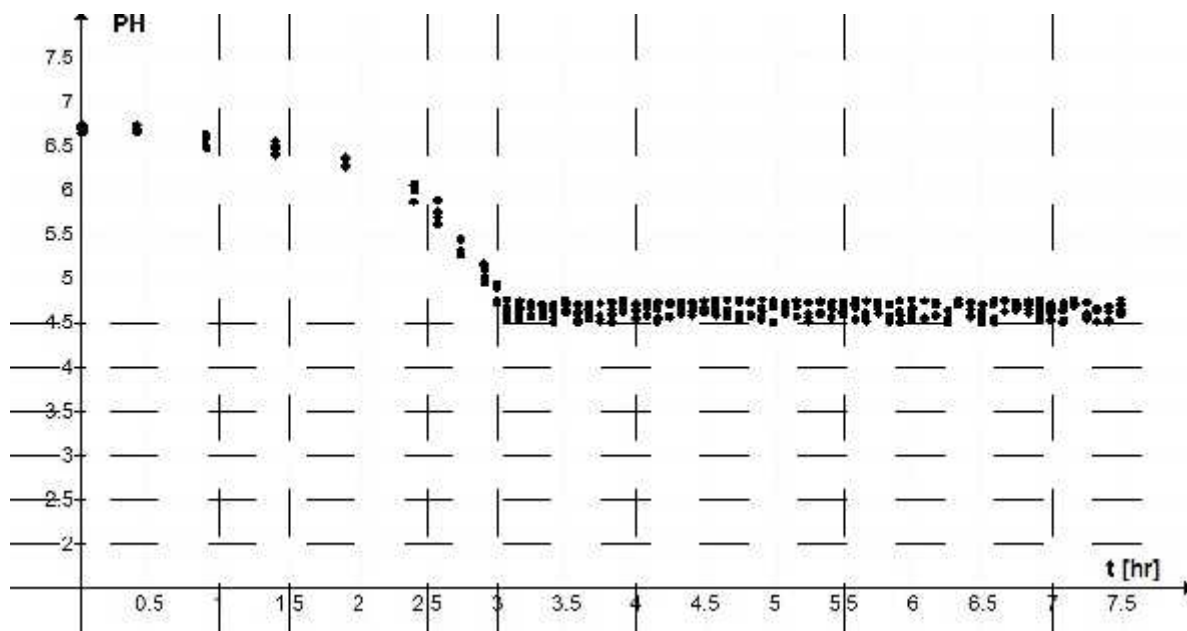
VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA CON EL TIEMPO



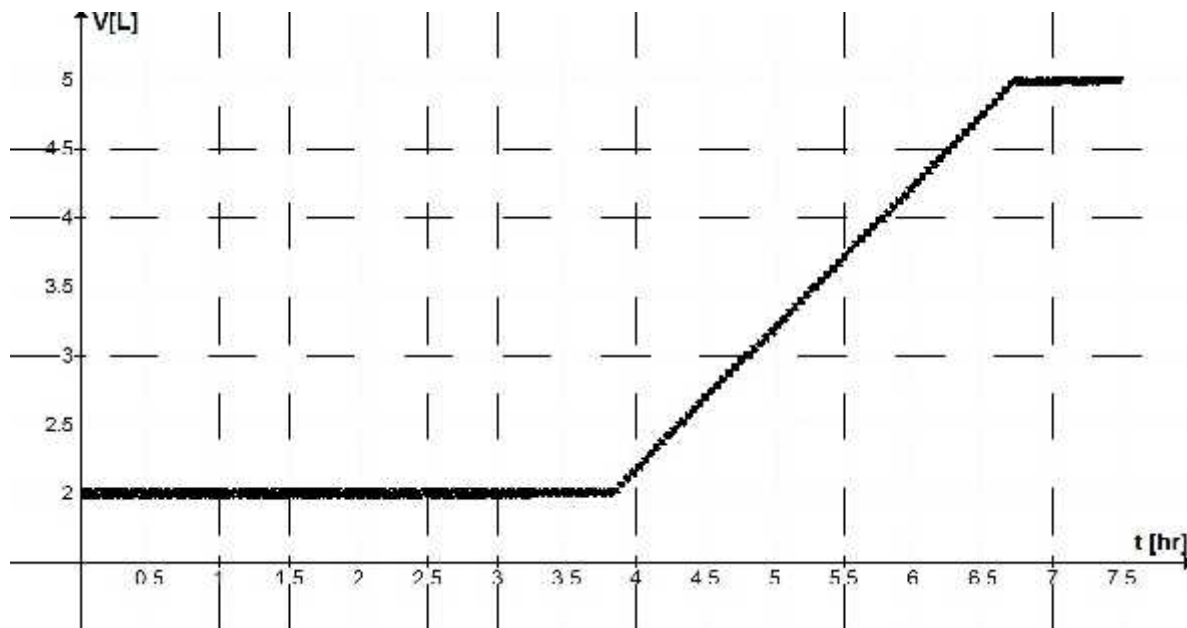
VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CON EL TIEMPO



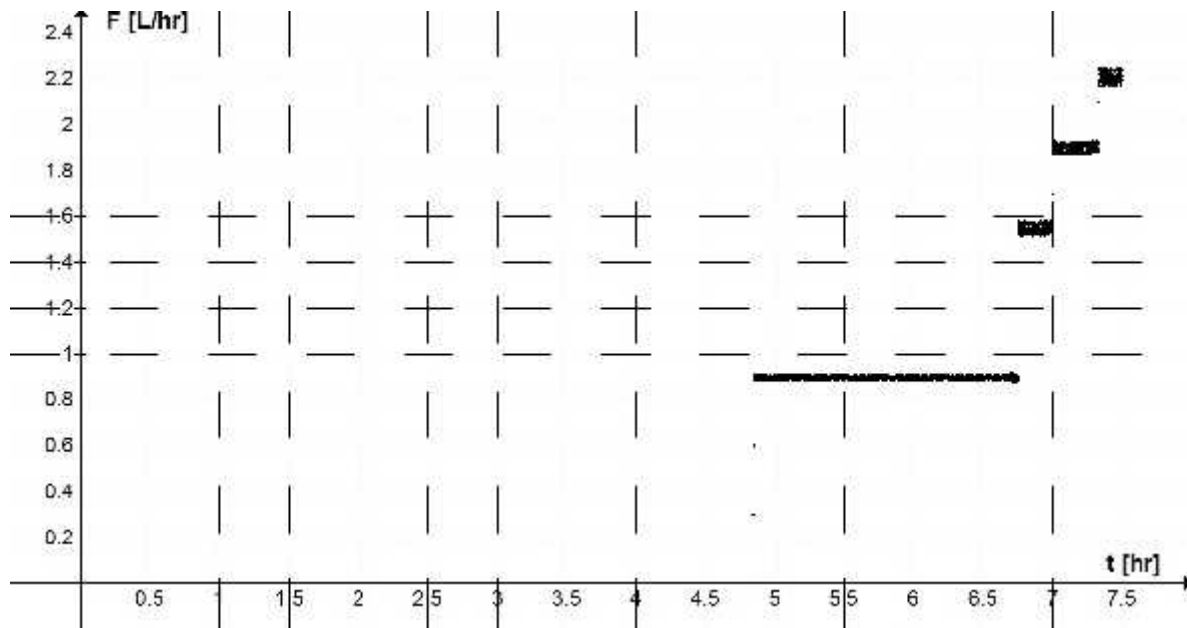
VARIACIÓN DEL PH CON EL TIEMPO



VARIACIÓN DEL VOLUMEN DEL SISTEMA CON EL TIEMPO



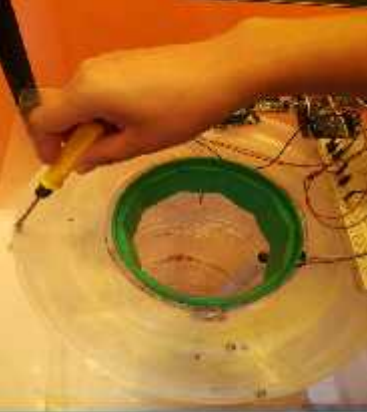





VARIACIÓN DEL FLUJO CON EL TIEMPO



ANEXO III

PROCEDIMIENTO GRÁFICO DE LA PRUEBA EN BLANCO

1. Verificación que no haya fugas de agua entre los tanques	2. Verificación de la conexión de los cables	3. Tapado de tanque de calefacción.
		
4. Tapado del tanque de operación.	5. Acoplamiento de la tubería del flujo.	6. Conexión del sensor del flujo.
		

7. Acoplamiento del tanque de alimentación.



8. Conexión USB con la Placa ARDUINO



9. Sensores externos para medición.



10. Medición de la Turbidez y pH



11. Descarga del tanque de operación Batch.



12. Descarga del tanque de operación Cultivo Continuo.



13. Medición de la Temperatura y nivel	14. medición de la concentración de sustrato.	15. Verificación de los valores obtenidos por los sensores.
		

ANEXO IV

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y EL CULTIVO MADRE

1. Limpieza del tanque de operación.	2. Limpieza del agitador.	3. Recepción de 12 litros de Leche natural
		
4. Adición de dos cucharas de leche en polvo.	5. Adición de 50g/L de azúcar	6. Pasteurización a 85 °C durante 7min
		

7. Calentamiento de 1L de Leche en el tanque de operación a 43.7 °C.



8. Preparación de cultivo para la adición al tanque de operación.



9. Adición de cultivo por medio de una jeringa al tanque de operación.



10. Control del proceso.



11. Toma de muestras en intervalos de 30-10-5 min



12. Medición del PH de la muestra



13. Dilución de 1ml de muestra en 100 ml de agua



14. Muestra diluida lista para medir la turbidez.



15. Medición de la turbidez de la muestra.



16. Medición de los grados Brix con el Lactómetro



17. Desarrollo del Cultivo continuo.



18. Obtención de Biomasa líquida.

