

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**Producción de kéfir y determinación de la cinética de crecimiento de los
granos de kéfir utilizados en su elaboración.**

PROYECTO DE GRADUACIÓN SOMETIDO A LA CONSIDERACIÓN DE LA ESCUELA
DE INGENIERIA QUÍMICA COMO REQUISITO FINAL PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN INGENIERIA QUIMICA

ISABELA DE SAINZ MOLESTINA

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO BRENES

SAN JOSÉ, COSTA RICA

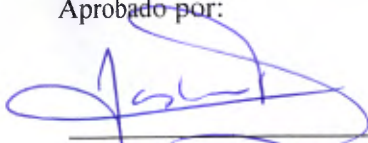
2019

Proyecto de graduación sometido a consideración de la Escuela de Ingeniería química como requisito final para optar el grado de Licenciatura en Ingeniería química.

Sustentante:

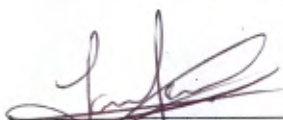
Isabela de Sainz Molestina

Aprobado por:



Ph.D. Esteban Durán Herrera
Director
Escuela de Ingeniería Química

Presidente del Tribunal



Ph.D. Lautaro Ramírez Varas
Profesor Asociado
Escuela de Ingeniería Química

Director del proyecto



Ing. Manuel Molina Córdoba
Profesor Asociado
Escuela de Ingeniería Química

Lector del proyecto



Ph D Mauricio Redondo Solano
Profesor Adjunto
Escuela de Microbiología

Lector del proyecto



Ing. Laura Saborío Marín
Docente Interina
Escuela de Ingeniería Química

Lectora del proyecto

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
I Semestre, 2019

Proyecto de graduación sometido a consideración de la Escuela de Ingeniería química como requisito final para optar el grado de Licenciatura en Ingeniería química.

Sustentante:

Isabela de Sainz Molestina

Aprobado por:

Ph.D. Esteban Durán Herrera
Director
Escuela de Ingeniería Química

Presidente del Tribunal

Ph.D. Lautaro Ramírez Varas
Profesor Asociado
Escuela de Ingeniería Química

Director del proyecto

Ing. Manuel Molina Córdoba
Profesor Asociado
Escuela de Ingeniería Química

Lector del proyecto

Ph D Mauricio Redondo Solano
Profesor Adjunto
Escuela de Microbiología

Lector del proyecto

Ing. Laura Saborío Marín
Docente Interina
Escuela de Ingeniería Química

Lectora del proyecto

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
I Semestre, 2019

"Se menos curiosos con la gente

Y más curioso con las ideas."

Marie Curie

Agradecimientos

Al doctor Mauricio Redondo por la ayuda y la atención durante todo el desarrollo del proyecto, por las ideas y recomendaciones a la hora de establecer procedimientos y por sobre todo el apoyo.

Al doctor Lautaro Ramírez por la ayuda y las ideas aportadas para realizar el análisis de resultados y por empujarme a realizar análisis estadísticos de mejor calidad.

A mi familia. Mi padre Antonio de Sainz, mi madre Marisol Molestina y mis hermanas Daniela de Sainz y Graciela de Sainz por todos el apoyo y guía durante todos mis años universitarios.

A mis amigos y compañeros por siempre darme apoyo y por convertirse en mi segunda familia durante estos años. En especial a Olman Vargas por siempre creer en mis ideas y empujarme a ser una mejor persona.

Resumen

Este proyecto tuvo como objetivo evaluar el desempeño de crecimiento de los granos de kéfir de leche tanto en biomasa como en poblaciones microbiológicas, en la cual se obtuvo un máximo de porcentaje de crecimiento de biomasa de 93,6% y un máximo de crecimiento en logaritmos de 5,01 en bacterias y de 5,43 en levaduras.

La investigación se dividió en cinco etapas experimentales y dos etapas de caracterización, una al inicio y una al final.

Se determinó el contenido de lactosa, ácido láctico y proteína de la leche tratada a Ultra Alta Temperatura 2% grasa marca Dos Pinos. Se realizaron las pruebas por triplicado y se obtuvo que la leche tiene un % de proteína de $3,29 \pm 0,027$ %m/v, un % ácido láctico de $0,15 \pm 0,0044$ %m/v y un % de lactosa de $5,23 \pm 0,16$ % m/v.

La primera etapa experimental consiste en la evaluación de métodos de preservación de granos de kéfir frescos, esto para evaluar cuál método garantiza un mayor porcentaje de supervivencia de las bacterias y levaduras dentro de los granos de kéfir y de esta manera poder utilizar este para el mantenimiento de los granos a través de toda la experimentación. El porcentaje de supervivencia de bacterias y levaduras obtenido por medio del método de congelación utilizando leche como fluido crio-protector fue el más alto con 94% y 87% respectivamente.

En la segunda etapa experimental se realiza un análisis estadístico de varianza para descartar cualquier cambio significativo que pueda haber entre los granos de kéfir frescos y granos de kéfir liofilizados comprados en Estados Unidos. Donde se obtiene que ($\alpha=0,05$) no se encuentra diferencia significativa en los crecimientos porcentuales de biomasa ni en los crecimientos logarítmicos tanto en la población de bacterias como en la de levaduras.

En la tercera etapa experimental se realiza un diseño central compuesto rotacional con tres factores (temperatura, agitación y relación masa de granos/volumen leche) y tres variables de respuesta, crecimiento porcentual de la biomasa, crecimiento logarítmico de la población de bacterias y el crecimiento logarítmico en la población de levaduras. Se obtienen tres modelos matemáticos uno para el crecimiento de biomasa, otro para el crecimiento en la población de bacterias y el último para el crecimiento en la población de levaduras.

En la cuarta etapa se realiza la optimización de los modelos matemáticos obtenidos anteriormente, donde la maximización de las tres variables de respuesta se alcanza cuando la fermentación se lleva a cabo a 25°C, 100 rpm y con 1/200 (g/mL). Se valida el modelo obteniendo un porcentaje de crecimiento de 93,6 % y un crecimiento logarítmico de 5,01 en bacterias y de 5,43 en levaduras. En la quinta etapa se realiza la cinética de crecimiento de biomasa a las mejores condiciones de crecimiento obtenidas por medio de la optimización local de los modelos matemáticos, a través de un tiempo de propagación de 36 horas para garantizar la llegada a la fase estable antes de alcanzar la fase de muerte de las bacterias.

En la última etapa, la etapa de caracterización, se realizan pruebas físicas para obtener la viscosidad, densidad y pH del producto obtenido a las condiciones de fermentación obtenidas en la cuarta etapa, también se realizan las pruebas a la materia prima utilizada para realizar una comparación. Se obtiene que el kéfir tiene una densidad de $1,0568 \pm 0,0001$ g/mL, una viscosidad de $14,5867 \pm 0,1531$ cP y un pH de $4,3267 \pm 0,0058$ y la leche utilizada como materia prima tiene una densidad de $1,0545 \pm 0,002$ g/ml, una viscosidad de $2,242 \pm 0,0201$ cP y un pH de $6,6433 \pm 0,0058$. Todas las propiedades medidas una temperatura de 25,1°C.

Índice General

	Página
Agradecimientos	iii
Resumen.....	iv
Índice General.....	vi
Índice de Cuadros	ix
Índice de Figuras.....	xi
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Leches fermentadas:.....	3
2.2 Probióticos:	3
2.3 Kéfir.....	4
2.3.1 Procesos de producción:.....	5
2.4 Características del kéfir:.....	6
2.4.1 Químicas:	6
2.4.2 Microbiológicas	7
2.4.3 Terapéuticas:	7
2.5 Fermentación láctica.....	8
2.6 Cinética:	9
CAPÍTULO 3.....	14
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL, MATERIALES Y EQUIPO.....	14
3.1 Materiales y equipo.....	14
3.1.2 Equipo Experimental.....	15
3.1.3 Sustrato	15
3.1.4 Microorganismos para la fermentación.....	15
3.2 Pruebas físicas y químicas y recuentos microbiológicos	15
3.2.1 Determinación másica de los granos de kéfir	15
3.2.2 Determinación de proteína	16
3.2.3 Determinación de lactosa.....	16

3.2.4 Determinación de ácido láctico.....	16
3.2.5 Recuentos microbiológicos.....	16
3.2.5 Densidad.....	17
3.2.6 Viscosidad.....	17
3.3 Primera etapa experimental. Métodos de preservación de los granos de kéfir.....	17
3.3.1 Congelado.....	18
3.3.2 Secado.....	18
3.3.3 Modelo estadístico utilizado.....	18
3.4 Activación y mantenimiento de granos.....	18
3.4.1 Variables fijas.....	18
3.5. Segunda etapa experimental. Comparación estadística entre tipos de granos.....	19
3.5.1 Variables fijas.....	19
3.5.2 Modelo estadístico utilizado.....	19
3.7 Cuarta etapa experimental. Validación de los modelos obtenidos en la tercera etapa experimental.....	22
3.7.2 Variable de respuesta.....	22
3.7.3 Modelo estadístico utilizado.....	22
3.8.1 Fermentaciones para determinación cinética.....	23
3.8.2 Variable respuesta.....	23
3.8.3 Modelo estadístico utilizado.....	23
3.9 Última etapa experimental. Caracterización física del producto final.....	23
3.9.1 Caracterización de muestras.....	24
CAPÍTULO 4.....	25
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	25
4.1 Caracterización de materia prima.....	25
4.2 Primera etapa experimental. Efecto del método de preservación.....	25
4.3 Segunda etapa experimental. Comparación estadística entre tipos de granos.....	27
4.4 Tercera etapa experimental. Diseño estadístico central compuesto rotacional.....	28
4.5 Cuarta etapa experimental. Maximización estadística de las variables de respuesta.....	33
4.6 Quinta etapa experimental. Cinética.....	36
4.6.1 Cinética de crecimiento de biomasa.....	36
4.6.2 Cinética de producción de ácido láctico.....	38
4.7 Última etapa de caracterización.....	39
4.8 Simulación de Monte Carlo.....	39

4.8.1 Primer escenario.....	40
4.8.2 Segundo escenario.....	41
4.9 Modelo de negocio: etapa desarrollada con AUGE.....	42
4.9.1 Descubrimiento del cliente.....	42
4.8.2 Diseño de la solución.....	42
4.8.3 Propuesta de valor.....	43
CAPÍTULO 5.....	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
5.1 Conclusiones.....	44
5.2 Recomendaciones:	46
CAPÍTULO 6.....	47
NOMENCLATURA.....	47
CAPÍTULO 7.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	48

Índice de Cuadros

	Página
Cuadro 2.2 Composición del kéfir según el Codex Alimentarius (WHO/FAO, 2011).....	6
Cuadro 3.1 Reactivos utilizados en el trabajo experimental.	14
Cuadro 3.2 Equipo empleado durante la investigación.....	15
Cuadro 3.3 Diseño central compuesto rotacional, condiciones.	21
Cuadro 4.1 Caracterización de materia prima.....	25
Cuadro 4.2 Recuentos comparativos entre tipo de cultivo.....	26
Cuadro 4.3 Comparación del desempeño de los tipos de granos.	28
Cuadro 4.4 Resultados de la maximización simultánea de las variables de respuesta obtenidas con el software y en experimentación.....	34
Cuadro 4.5 Resultados de la maximización con agitación fija a 0 rpm.	36
Cuadro 4.6 Parámetro de la cinética de crecimiento de biomasa para de Weibull modificada.	37
Cuadro 4.7 Parámetros de la cinética de producción de ácido láctico para modelo de Gompertz..	38
Cuadro 4.8 Propiedades de la leche y el kéfir medidas a 25 °C.....	39
Cuadro A.1 Datos de volumen para determinación de proteína, lactosa y ácido láctico en leche..	54
Cuadro A.2 Datos de conteos previos a métodos de preservación.....	54
Cuadro A.3 Datos de conteos posterior a métodos de preservación para granos locales.....	54
Cuadro A.4 Datos de biomasa antes y después y conteos después de fermentación a 35°C, 55 rpm y 27.5 g/L para granos comerciales.	54
Cuadro A.5 Datos de biomasa antes y después y conteos después de fermentación a 35°C, 55 rpm y 27.5 g/L para granos locales	54
Cuadro A.6. Conteos de bacterias y levaduras iniciales para el diseño experimental	54
Cuadro A.6 (continuación). Conteos de bacterias y levaduras iniciales para el diseño experimental	55
Cuadro A.7. Masa final y conteos finales para el diseño experimental	55
Cuadro A.7 (continuación) Masa final y conteos finales para el diseño experimental	56
Cuadro A.8 Volúmenes de titulación para determinaciones químicas de experimentos del diseño experimental.....	56
Cuadro A.9 Datos de masa final (g) para la cinética de biomasa.....	56
Cuadro A.9 (continuación) Datos de masa final (g) para la cinética de biomasa.	57
Cuadro A.10 Datos de volumen de titulación de acidez titulable para cinética de ácido láctico....	57

Cuadro A.10 (continuación) Datos de volumen de titulación de acidez titulable para cinética de ácido láctico.	58
Cuadro A.11 Datos para cálculo de densidad de kéfir.	58
Cuadro A.12 Datos para cálculo de viscosidad de kéfir	58
Cuadro A.14 Datos para cálculo de densidad de leche.	58
Cuadro A.15 Datos para cálculo de viscosidad de leche	58
Cuadro B.1 Determinación de proteína, lactosa y ácido láctico en leche y promedios	59
Cuadro B.2 Datos de conteos previos a métodos de preservación.	59
Cuadro B.3 Datos de conteos posterior a métodos de preservación para granos locales.	59
Cuadro B.4 Datos de crecimiento de biomasa y conteos después de fermentación a 35°C, 55 rpm y 27.5 g/L para granos comerciales.	59
Cuadro B.5 Datos de crecimiento de biomasa y conteos después de fermentación a 35°C, 55 rpm y 27.5 g/L para granos locales	59
Cuadro B.6. Conteos iniciales para el diseño experimental, promedio y desviación.	60
Cuadro B.7. Masa final y conteos finales para el diseño experimental.	60
Cuadro B.7 (continuación) Masa final y conteos finales para el diseño experimental	61
Cuadro B.8 Porcentajes de proteína, lactosa y ácido láctico para experimentos del diseño experimental.	61
Cuadro B.9 Crecimientos de biomasa y conteos.	61
Cuadro B.9 (continuación) Crecimientos de biomasa y conteos.	62
Cuadro B.10 Datos de concentración final (g/L) para la cinética de biomasa.	62
Cuadro B.10 Datos de concentración final (g/L) para la cinética de biomasa.	63
Cuadro B.11 Datos de volumen de titulación de acidez titulable para cinética de ácido láctico, menos volumen de titulación utilizado en leche.	63
Cuadro B.12 Densidad de kéfir a 25°C.	63
Cuadro B.13 Viscosidad del kéfir a 25°C	64
Cuadro B.14 pH del kéfir a 25°C	64
Cuadro B.15 Densidad de leche a 25°C.	64
Cuadro B.16 Viscosidad de la leche a 25°C	64
Cuadro B.17 pH de la leche a 25°C	64
Cuadro D.1 Factores para lactosa y azúcar invertido (10 ml disolución de Fehling)	71

Índice de Figuras

	Página
Figura 2.1 Macroestructura de los granos de kéfir. (Elaboración propia, 2018).....	5
Figura 2.2 Principales vías de fermentación para BAL (Elaboración propia, 2018)	9
Figura 2.3 Curva de crecimiento de biomasa (Elaboración propia, 2018).....	11
Figura 4.1 Supervivencia de microorganismos en los granos de kéfir locales antes y después de los métodos de preservación.	27
Figura 4.7. Optimización gráfica simultánea para las tres variables de respuesta.	35
Figura 4.8 Cinética de la producción de biomasa.	37
Figura 4.9 Cinética de la producción de ácido láctico.	38
Figura 4.10 Distribución de probabilidad del crecimiento logarítmico neto de bacterias para el primer escenario.	40
Figura 4.11 Distribución de probabilidad del crecimiento logarítmico neto de bacterias para el segundo escenario.	41

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los probióticos, según la FAO/WHO (2011), son definidos como suplementos alimenticios de origen microbiano que presentan beneficios en la salud del consumidor. La mayoría de los probióticos encajan dentro de la categoría de bacterias ácido lácticas (bacterias productoras de ácido láctico).

Los alimentos funcionales son aquellos que presentan funciones específicas por medio de la adición de ingredientes específicos, están siendo adaptados para la prevención de enfermedades categorizadas como prevenibles. La OMS indica que las enfermedades no transmisibles (ENT) son altamente prevenibles por medio del consumo de este tipo de alimentos.

Según Heyman (2006) un 70% de la población mundial sufre de intolerancia primaria a la lactosa, aquella que ocurre cuando hay una deficiencia de la enzima lactasa, por lo tanto, la investigación sobre productos funcionales a partir de lácteos que tengan una gran cantidad de bacterias ácido lácticas además de presencia de enzimas para facilitar la digestión de la lactosa una vez consumida es de gran importancia.

Ahora bien, Costa Rica es un país con una gran producción de leche, es decir, que se cuenta con abundante materia prima, además de ser el mercado consumidor de lácteos más grande de América Central. Esto unido al alto porcentaje de población con intolerancia a los lácteos supone un mercado amplio para el desarrollo de un producto funcional en este campo, que, además, ayuda a la gradual reducción de los síntomas de dicha intolerancia.

Prado, Blandón, Vandenberghe, Rodrigues, Castro, Thomaz-Soccol & Soccol (2015) señalan que las personas que consumen kéfir muestran niveles altos de probióticos en los intestinos. Además, el kéfir contiene la enzima β -galactosidasa, que sigue activa al ser consumida, lo cual es

beneficiosos para aquellas personas intolerantes a la lactosa, pues facilita la hidrólisis de esta, disminuyendo los efectos de dicha intolerancia.

Más aún, Howarth, & Wang (2013) señala que el consumo de probióticos y sus derivados tiene grandes beneficios para la salud humana, entre ellos, la mejora de la función inmune del cuerpo y de la función intestinal, así como el mantenimiento de la integridad de los intestinos e, inclusive, la prevención de enfermedades no transmisibles como el cáncer de colon.

Presentada esta situación el objetivo general del proyecto es producir una bebida que cumpla con las especificaciones, hechas por el Codex Alimentarius, para bebidas fermentadas a base de leche y determinar la cinética de las bacterias utilizadas en su producción, análisis que se realizará posterior a la determinación de las mejores condiciones de crecimiento de estas. La autora de esta investigación considera que también resulta de importancia el desarrollo de este proyecto pues sirve como base para estudios posteriores en el marco de la Universidad de Costa Rica, sobre los beneficios específicos de los granos de kéfir y del kéfir (como bebida probiótica).

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Leches fermentadas

Las leches fermentadas son los productos obtenidos por medio de la disminución del pH de la leche mediante la fermentación láctica a través de la adición de cultivos de microorganismos específicos. Este tipo de proceso es uno de los métodos más antiguos para extender la vida útil de la leche y ha sido practicado por miles de años.

Productos de leche fermentada son elaborados en todo el mundo, estos se podrían clasificar de la siguiente manera; según se observa en el siguiente cuadro.

Cuadro 2.1 Tipos de leche fermentadas (Tamime, 2002).

Tipo de fermentación	Ejemplos
Fermentación láctica (mesofílica)	Crema agria. filmjök (origen sueco)
Fermentación láctica (termofílica)	Yogur, leche búlgara y zabadi (yogur griego)
Fermentación láctica (terapéutica, probiótica)	Leche acidophilus, Yakult (origen japonés)
Fermentación láctica y con levaduras	Kéfir y koumiss
Fermentación láctica y con moho	Viili

2.2 Probióticos

Los probióticos se definen actualmente como cultivos microbianos vivos consumidos para beneficiar la salud y además proporciona un valor nutricional básico (Parvez, Malik, Kang & Kim, 2005). La industria de los probióticos está en crecimiento al igual que el interés de parte de las compañías de establecer credibilidad científica sobre sus productos. Según Parvez et al (2005) los criterios de selección para considerar a una bacteria como probiótico son:

1. Aportar un efecto benéfico en el huésped.

2. Aportar recuentos celulares altos y que sigan siendo viables a través de toda la vida útil del producto.
3. Soportar en tránsito a través del tracto gastro-intestinal.
4. Adherirse al revestimiento epitelial del intestino y colonizar el lumen del tracto.
5. Producir sustancias antimicrobianas hacia patógenos.
6. Estabilizar la microflora intestinal.

Los probióticos muestran una gran gama de beneficios para la salud, pero solo algunos de ellos tienen la suficiente evidencia y documentación científica para considerarse benéficos para la salud. Los síntomas y enfermedades que han sido clínicamente tratadas y propiamente documentados por medio del consumo de probióticos incluyen diarrea, gastroenteritis, colitis (síndrome de colon irritable), enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Chron y colitis ulcerosa), función inmune deprimida, digestión inadecuada de la lactosa, alergias, enfermedades hepáticas e infecciones por *Helicobacter pylori* (Brown & Valiere, 2006; Aragon, Graham, Borum & Doman, 2010; Isolauri, Kirjavainen & Salminen, 2002).

2.3 Kéfir

El kéfir es una leche fermentada producida por medio de la acción fermentativa de bacterias y levaduras que existen en una relación simbiótica dentro de los granos de kéfir. Esta bebida es originaria de las montañas caucásicas y es consumida en gran cantidad en Rusia, Europa del Este y el suroeste asiático, en la última década su producción y consumo ha aumentado alrededor del mundo debido sus propiedades sensoriales únicas y su asociación con efectos benéficos para la salud humana, no obstante, su producción sigue en su mayoría siendo de manera artesanal. (Leite, Miguel, Peixoto, Rosado, Silva & Paschoalin, 2012).

Los granos de kéfir juegan el papel de cultivo iniciador natural durante el proceso de producción de kéfir y estos se recuperan por medio de filtrado al finalizar la fermentación. Estos están compuestos de microorganismos adheridos a una matriz de polisacárido y proteína, donde coexisten en asociación simbiótica varias especies de bacterias y levaduras. La población de microorganismos es relativamente estable y produce metabolitos bioactivos que son esenciales para el crecimiento de los granos (biomasa) al igual que para la inhibición de microorganismos como patógenos y contaminantes (Prado et al., 2015). Pareciera que por las fotografías a nivel macroscópico y microscópico de los granos de kéfir reportados en la literatura estos muestran poca

o ninguna variación con respecto a las bacterias y levaduras que coexisten dentro de ellos (Lopitz-Otsoa, Rementeria, Elguezabal & Garaizar, 2006).

Los granos de kéfir varían en tamaño (de 0.3 a 3 cm), son irregulares y su color varía de blanco a amarillo claro dependiendo de la leche en la que se inoculen, estos se pueden observar en la Figura 2.1 donde el espacio entre cada raya de color negro representa 0.5 cm (5 mm). Los granos están cubiertos de una capa de líquido viscoso llamado kefiran, este es un glucogalactano (polisacárido) soluble en agua producido por diferentes lactobacilos presentes en el kéfir y responsable de la mayoría de los beneficios presentes en el kéfir (Lopitz-Otsoa, 2006).

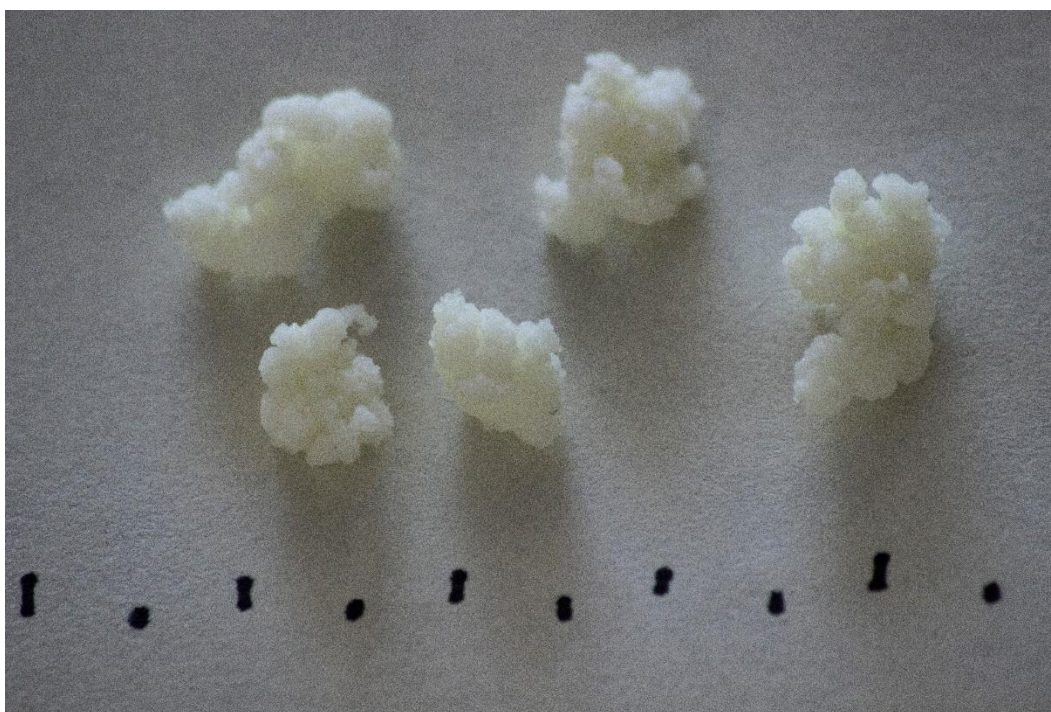


Figura 2.1 Macroestructura de los granos de kéfir (Elaboración propia, 2018).

2.3.1 Procesos de producción

Tradicionalmente el kéfir es producido utilizando leche de vaca, búfalo o cabra. Existen tres formas de producir kéfir: la artesanal y dos formas comerciales. El método artesanal consiste en la inoculación de la leche con una cantidad variable de granos de kéfir y una fermentación que varía entre 18-24 h a una temperatura de 20-25 °C (Leite et al., 2012). Comercialmente es producido utilizando dos métodos: el método ruso o el método de cultivos puros. El primero se trata de un proceso donde se produce a mayor escala utilizando una serie de pasos empezando por el proceso

de fermentación utilizando granos de kéfir y utilizando el líquido filtrado. El segundo utiliza cultivos puros aislados de los granos de kéfir o de otros cultivos comerciales, en este se inocula la leche con cultivos DVS estos se encuentran congelados en seco y son adicionados directamente a la leche. Estos cultivos no son reutilizables, una vez usados dejan de ser útiles para una segunda fermentación (Prado et al., 2015).

2.4 Características del kéfir

2.4.1 Químicas

La composición química del kéfir depende de diferentes variables entre ellas el tipo y volumen de leche (en relación con la masa de granos de kéfir) utilizada en su producción, la composición de los granos utilizados y por último el proceso utilizado en su producción (Arslan, 2014).

El kéfir, como bebida, típicamente contiene entre 89-90% de humedad, 0,2% de lípidos, 3,0% proteína, 6,0% de azúcar, 0,7 % cenizas y 1,0% ácido láctico (Setyowati & Setyani, 2016). Por otro lado, Wszolek, Tamime, Muir & Braclay (2001) estudiaron las propiedades del kéfir en Escocia y Polonia utilizando leche bovina, caprina y ovina y encontraron que la composición era de entre 10,6-14,9% de sólidos totales, 2,9-6,4 % de proteína, 3,8-4,7 % de azúcares y 0,7-1,1% de ceniza; por su parte, Liutkevicius & Sarkinas (2004) obtuvieron que la biomasa de granos de kéfir tiene una composición con 86,3% de humedad y 13-7% materia seca, donde la última comprende de 4,5% proteína, 1,2% ceniza, 0,2% tejido celular y 0,03% lípidos. El Codex Alimentarius (WHO/FAO, 2011) en su documento de lácteos y productos lácteos presenta los estándares de calidad esperados para este producto, estos se muestran en el Cuadro 2.2.

Cuadro 2.2 Composición del kéfir según el Codex Alimentarius (WHO/FAO, 2011).

Parámetro	Kefir
Proteína (%m/m)	mín 2,7
Grasa Láctea (%m/m)	menos de 10
Acidez titulable (%m/m)	mín 0,6
Etanol (%m/m)	-
Suma de bacterias y levaduras (log(cfu/g))	mín 7
Levaduras log((cfu/g))	mín 4
Lactosa (%m/m)*	Entre 4-6

* (Gao X. & Li B., 2016)

2.4.2 Microbiológicas

La población microbiológica que se encuentra en los granos de kéfir a sido citada numerosas veces como una comunidad simbiótica de microorganismos, debido a esta relación simbiótica resulta difícil la identificación y estudio de los microorganismos que constituyen los granos de kéfir por medio de métodos tradicionales (Simova, Beshkova, Angelov, Hristozova, Frengova & Spasov, 2002), además el estudio de dichos autores logró identificar únicamente entre 83-90% de bacterias ácido lácticas y 10-17% de las levaduras presentes en los granos de kéfir.

Utilizando una combinación de métodos fenotípicos y genotípicos, Magalhães, Pereira, Campos, Dragone & Schwan (2011), lograron identificar 359 microorganismos aislados de los cuales 60,5% eran bacterias ácido-lácticas, 30,6% levaduras y 8,9% bacterias ácido-acéticas. Korsak, Taminiu, Leclercq, Crevecoeur, Ferauche, Delcenserie & Daube (2015) utilizaron análisis metagenómico en cinco tipos diferentes de granos de kéfir, la secuenciación revelo que hay 6 especies dominantes y presentes en todos los granos estudiados: *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Gluconobacter frateurii*, *Lactobacillus kefiri*, *Acetobacter orientalis* y *Acetobacter lovaniensis*. Se estudio la microbiota de los granos de kéfir en Tibet con electroforesis en gel seguido por secuenciación y se encontró que las especies dominantes son *Pseudomonas sp.*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus casei*, *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kazachstania exigua* (Jianzhong, Xiaoli, Hanhu & Mingsheng, 2009).

Por otro lado, se ha reportado que los valores en recuentos celulares varían entre $6,4 \times 10^4$ y $8,5 \times 10^8$ cfu/g en bacterias y entre $1,5 \times 10^5$ y $3,7 \times 10^8$ cfu/g en levaduras (Witthuhn, Schoeman & Britz, 2004).

2.4.3 Terapéuticas

Históricamente el kéfir ha sido recomendado para el tratamiento de diversas condiciones clínicas y alivio de síntomas de diferentes enfermedades como problemas gastrointestinales, alergias y otros. Fermentaciones por medio de granos de kéfir han sido, en numerosas ocasiones, evaluados y estudiados y un gran rango de compuestos bioactivos se han encontrado, entre estos están los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, etanol, proteínas bioactivas, polisacáridos (kefiran) y

bacteriocinas (Leite et al, 2012). A continuación, se mencionan algunos de los estudios realizados para la comprobación de los beneficios terapéuticos del kéfir.

Huseini, Rahimzadeh, Fazeli, Mehrazma & Salehi (2012) comprobaron la capacidad antibacterial y antiinflamatoria de los geles presentes en los granos de kéfir por medio del tratamiento de quemaduras infectadas con *Pseudomonas aeruginosa* en ratones. Liu, Wang, Lin & Lin (2013) estudiaron la capacidad antitumoral del kéfir de leche y del kéfir de leche de soya en ratones inoculados con sarcoma, obtuvieron una inhibición del tejido canceroso del 64,8% y 70,9%, respectivamente. Medrano, Racedo, Rolny, Abraham & Pérez (2011) probaron la capacidad del kefir en la regulación del sistema inmune a través de la mucosa del tracto gastro intestinal. Liu, Wang, Chen & Chen (2006) presentan un estudio donde evalúan las propiedades hipocolesterolemica del kéfir de leche y de leche de soya, en este estudio se prueba la capacidad del kéfir de inhibir la absorción de colesterol en el intestino y por lo tanto prevenir enfermedades cardiovasculares.

2.5 Fermentación láctica

Las bacterias ácido-láctica (BAL) tienen un rol central en los procesos fermentativos, en las leches fermentadas tienen en papel de convertir la lactosa en ácido láctico por lo que la acidez aumenta y como consecuencia la proliferación de otros microorganismos se vuelve difícil y desfavorable (Shiby & Mishra, 2013).

Las BAL son un grupo heterogéneo de bacterias Gram Positivas con metabolismos estrictamente fermentativos, las dos funciones más importantes es por un lado su habilidad de convertir lactosa (y otros carbohidratos) en ácido láctico, y por otro lado su capacidad de ejercer acción antagonista hacia microorganismos patógenos y peligrosos (Temmerman, Huys & Swings, 2004).

Las principales especies de BAL que se encuentran en las leches fermentadas son *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Lactococcus*. Estas bacterias tienen dos principales vías de fermentación:

1. Vía homoláctica: donde su principal producto es el ácido láctico (más de 90%)
2. Vía heteroláctica: se produce ácido láctico (50%) al igual que dióxido de carbono, etanol y ácido acético.

En términos generales la vía homoláctica convierte una molécula de un azúcar de 6 carbonos (glucosa) en dos moléculas de ácido láctico, almacenando la energía en dos moléculas de ATP

(Shiby & Mishra, 2013). Podemos observar los mecanismos de ambas vías de fermentación de las bacterias ácido-lácticas en la Figura 2.2

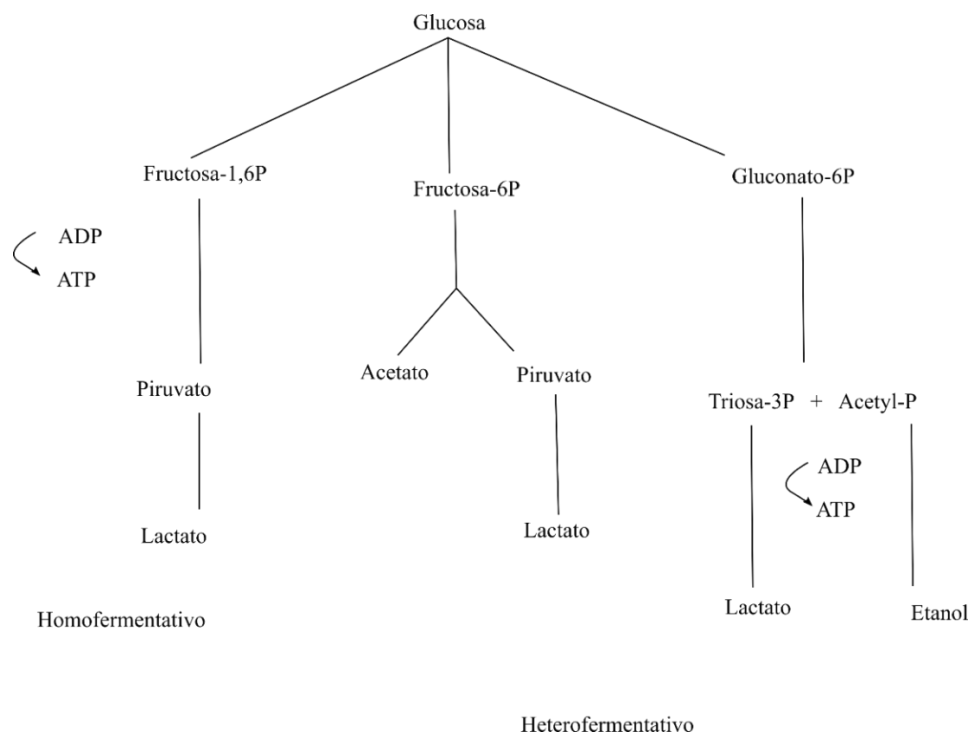


Figura 2.2 Principales vías de fermentación para BAL (Elaboración propia, 2018)

2.6 Cinética

La cinética de una reacción se define como la velocidad de formación o consumo de una sustancia, esta velocidad depende de muchas variables, las más comunes son: temperatura y las concentraciones de reactivos y productos. Las reacciones donde intervienen microorganismos tales como: hongos, algas y bacterias se les conoce como biorreacciones, el análisis matemático de las mismas puede proporcionar información importante sobre la funcionalidad de las bacterias y puede contribuir a la selección y diseño de un proceso adecuado. Los datos cinéticos son necesarios para entender el proceso de fermentación y para el desarrollo de sistemas de fermentación continuos (Shiby & Mishra, 2013).

El producto clave de la fermentación láctica, como se discutió anteriormente, es el ácido láctico, producto valioso en la industria alimentaria al igual que en la industria farmacéutica. La cinética de leches fermentadas por cultivos iniciadores ha sido estudiada por diversos científicos, en la ecuación (2.1) se muestra la expresión general con la que se puede describir el crecimiento microbiano (Kargi, 2009).



Donde S, B y P son el sustrato, la biomasa y el producto respectivamente. La reacción es autocatalítica ya que el biocatalizador (biomasa) es generada por medio de la reacción.

Cuando un volumen fijo de medio líquido es inoculado con células microbianas obtenidas a partir de un cultivo que fue colonizado hasta la saturación y se mide periódicamente el número de células viables por mililitro para obtener una gráfica, generalmente esta tiene la forma mostrada en la Figura 2.3. Dicha gráfica está dividida en 4 etapas que se explicaran a continuación:

La primera etapa se denomina la etapa latente, periodo durante el cual las células, sin metabolitos a causa de estar en un nuevo ambiente, se adaptan a este. Se empiezan a formar y acumular enzimas y sustancias intermedias hasta que la concentración de estos permita el inicio de la reproducción. Cuando el cultivo se coloca en un medio totalmente diferente las células son incapaces de crecer en el nuevo medio, por lo tanto, esta zona sería prolongada y este corresponde al tiempo en el cual las células deben mutar para adaptarse al nuevo medio.

La segunda etapa es la etapa exponencial en la cual se sintetiza material celular nuevo a una velocidad constante, material que es catalítico, por esta razón el aumento es de forma exponencial. Esta etapa persiste hasta que suceden una de dos cosas, se agotan los nutrientes en el medio o se acumulan productos metabólicos nocivos que inhiben la proliferación de las bacterias en el medio. La tercera etapa es la etapa estacionaria máxima donde el agotamiento de los nutrientes o la producción de metabolitos nocivos provoca que la proliferación se detenga.

La cuarta etapa es la etapa de declinación o la etapa de muerte, donde después de un tiempo de estar en la etapa estacionaria el índice de muerte de eleva hasta alcanzar un nivel estable, la tasa de muerte es más lenta que la tasa de proliferación exponencial. Una vez que muere la mayor parte de celular la tasa disminuye y solo permanecen viables un pequeño número de supervivientes por meses o inclusive años (Brooks, Carroll, Butel, More & Mietzner, 2013).

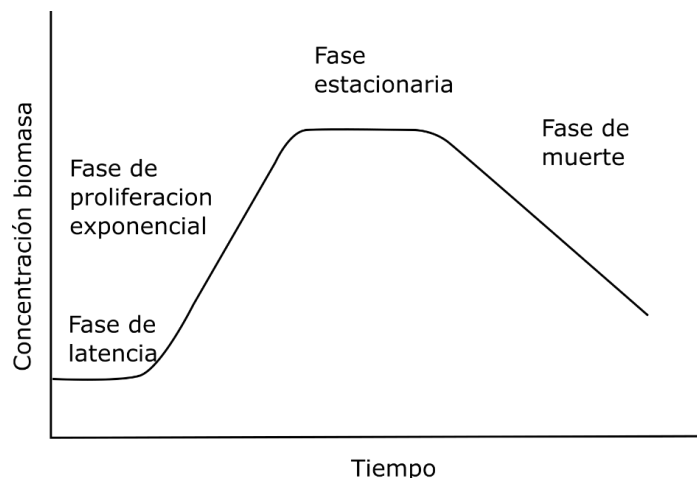


Figura 2.3 Curva de crecimiento de biomasa (Elaboración propia, 2018).

Las ecuaciones más utilizadas para describir las tasas de crecimiento de biomasa son la ecuación logística y la ecuación de Monod, la primera considera únicamente la concentración de biomasa sin tomar en cuenta la utilización de sustrato, la segunda considera la concentración de biomasa al igual que la razón limitante de sustrato (Kargi, 2009). La ecuación logística está siendo utilizada de manera creciente para la descripción del crecimiento de biomasa microbiana para diversos sistemas biológicos, al igual que para la predicción de la inhibición e inactivación del crecimiento microbiano, pero no predice la fase de muerte después de la fase estacionaria (Zajšek & Goršek, 2010). Los niveles de sustrato no son de interés en el estudio presente ni para la aplicación de interés, se asume que hay suficiente sustrato para mantener número intolerables de microorganismos, de manera tal que se utilizará la ecuación logística para modelar el crecimiento de kéfir durante la fermentación por tandas.

La ecuación logística utilizada para describir crecimiento microbiano se muestra en la ecuación (2.2).

$$\frac{dB}{dt} = kB_{max} \left(1 - \frac{B}{B_{max}} \right) \quad (2.2)$$

Donde:

t : es tiempo, h.

k : es la constante de crecimiento biomásico h^{-1} .

B_{max} : es máxima concentración de biomasa g/ L.

La forma integral de la ecuación logística de crecimiento cuando la concentración es igual a la concentración inicial cuando el tiempo es igual a cero se muestra en la ecuación (2.3)

$$B = \frac{B_i \exp^{kt}}{1 - \left(\frac{B_i}{B_{max}}\right) (1 - \exp^{kt})} \quad (2.3)$$

Donde:

B_i : es la concentración inicial de biomasa, g/L.

Por otro lado, según Kargi (2009), la tasa de crecimiento de la ecuación logística está matemáticamente relacionada con las constantes de la cinética de Monod. En la ecuación 2.4 se muestra la forma diferencial de la cinética de Monod mientras que en la ecuación 2.5 se muestra la relación entre tasa de crecimiento.

$$\frac{dX}{dt} = \left(\frac{\mu_{max} S}{K_s + S}\right) X \quad (2.4)$$

Dónde:

μ_{max} : es crecimiento celular máximo, g/L h.

S : es concentración del sustrato, g/L.

K_s : concentración limitante de crecimiento (Fogler, 2008)

$$k = \frac{\mu_{max}}{K_s} S_i = Q S_i \quad (2.5)$$

Donde

Q : tasa de crecimiento para la cinética de Monod, h^{-1} . (Kargi, 2009)

Según Pradhan A., Li M., Li Y., Kelso L., Costello T & Johnson M. (2012) se puede utilizar la ecuación de Weibull modificada para obtener la modelación de la cinética de crecimiento al igual que de supervivencia. La ecuación de Weibull modificada se muestra en la ecuación 2.6.

$$B = B_{max} - B_i \exp(-k(t_a - t)^z) \quad (2.4)$$

Dónde:

z : constante de forma, adim.

t_a : es el tiempo de adaptación celular, h.

En el estudio presente el producto deseado es ácido láctico por lo que se enfoca en esto. En años reciente muchos modelos matemáticos se han desarrollado para la descripción de sistemas

biológicos, en específico sistemas de crecimiento microbiano, la formación de productos y subproductos formados en procesos de fermentación.

Un modelo comúnmente utilizado para formación de productos es la ecuación modificada de Gompertz mostrada en la ecuación 2.6, la cual considera el tiempo de producción máxima, el máximo producido y el tiempo de adaptación celular (Zajšek & Goršek, 2010).

$$C_{ac} = C_{max,ac} \exp\left(-\exp\left(\frac{e^1 r_{ac}}{C_{max,ac}} (t_a - t) + 1\right)\right) \quad (2.6)$$

Donde:

C_{ac} : es la concentración de ácido láctico, g/L.

$C_{max,ac}$: es la concentración máxima de ácido láctico, g/L.

r_{ac} : es la tasa de producción máxima, g/Lh.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL, MATERIALES Y EQUIPO

Este proyecto tiene como objetivo general evaluar el desempeño de crecimiento de los granos de kéfir de leche tanto en biomasa como en poblaciones microbiológicas. Para esto se emplean varias pruebas de caracterización de los sustratos y, se realizan varias etapas experimentales, de las cuales las primeras dos etapas son independientes entre sí y se hacen de manera preliminar, con el fin de obtener las mejores condiciones para la preservación de los granos y la estabilidad microbiológica de los mismos. En este capítulo se presentarán los materiales, equipos, variables, métodos y el diseño estadístico en las etapas en las que se requiera.

3.1 Materiales y equipo.

3.1.1 Reactivos

Cuadro 3.1 Reactivos utilizados en el trabajo experimental.

Reactivo	Proveedor	Pureza
Ácido sulfúrico	Merck Millipore	95-97%
Dioxido de titanio anhidro	Sigma-Aldrich	99,5%
Fenolftalína	Honeywell Riedel-de Häen	99,9%
Hidróxido de sodio	Labquimar	97%
Rojo de Metilo	-	-
Sulfato de cobre	Merck Millipore	< 95%
Ferrocianuro de potasio	Sigma-Aldrich	99%
Sulfato de zinc	J T Baker	99,2%
Tartrato de sodio y potasio	UCR	-
Zinc en polvo	Honeywell Riedel-de Häen	99,9%
Glucosa	Sigma-Aldrich	99,5%
Sulfato de potasio	Sigma-Aldrich	99%

3.1.2 Equipo Experimental

Cuadro 3.2 Equipo empleado durante la investigación.

Equipo	Fabricante	Ámbito
Autoclave	TOMIN	0,3 kg cm ⁻²
Balanza semianalítica	Sartorius	0-620 g (0.001 g)
Incubadora con agitación orbital	Shel Lab	8-60°C (0.1°C)
Horno	Blue M	0-300 °C
Cámara de seguridad microbiológica con flujo laminar	Labculture	-
Digestor Kjeldhal	LabConco	-
Sistema de destilación automático para Kjeldhal	LabConco	200-800 mL
Viscosímetro	Cole-Palmer	1,6-28 cST
pHmetro	OAKTON	-
Picnómetro	LMS	10 ml

3.1.3 Sustrato

Para el trabajo experimental se utilizó leche tratada a Ultra Alta Temperatura (UHT) con 2% grasa marca Dos Pinos adquirida en un supermercado local.

3.1.4 Microorganismos para la fermentación

Los granos de kéfir utilizados en este estudio provienen de dos fuentes; unos granos fueron obtenidos localmente de hogares costarricenses y los otros fueron obtenidos comercialmente a través de la compañía estadounidense Cultures for HealthTM; estos últimos se obtienen como grano de kéfir liofilizados.

3.2 Pruebas físicas y químicas y recuentos microbiológicos

Se realizan diferentes pruebas químicas y recuentos microbiológicos antes y después de las fermentaciones a realizar a través del experimento, estas se explican a continuación.

3.2.1 Determinación másica de los granos de kéfir

Se pesa la masa de granos de kéfir antes y después de la fermentación y utilizando la ecuación 3.1 se calcula el porcentaje de crecimiento de los granos durante la fermentación.

$$\% \text{ } bm = \frac{(bm_f - bm_i)}{bm_i} * 100 \quad (3.1)$$

Donde:

% bm : porcentaje de crecimiento de biomasa.

bm_i : peso de biomasa al inicio, g.

bm_f : masa de la biomasa después de fermentación, g.

3.2.2 Determinación de proteína

La determinación de proteína por medio del método Kjeldhal se hizo con el procedimiento descrito por la norma ISO 8968-1 (2014), el cual se detalla en el apéndice D.

3.2.3 Determinación de lactosa

La determinación de lactosa por medio del método Lane y Eynon (utilizando soluciones de Fehling) se hizo siguiendo el procedimiento descrito por la norma GB 5413.5 del *National Food Safety Standard* (2010), también se utilizó de guía el Manual de Normas Analíticas del Instituto Adolfo Lutz (2008). Este procedimiento se detalla en el apéndice D.

3.2.4 Determinación de ácido láctico

La determinación de acidez expresada como ácido láctico por medio del método de valoración o titulación se realizó siguiendo el procedimiento descrito por la norma NMX-F-420 de la Dirección General de Normas en México (1982), también se utilizó de guía el Manual de Normas Analíticas del Instituto Adolfo Lutz (2008). Este procedimiento se detalla en el apéndice D.

3.2.5 Recuentos microbiológicos

Las poblaciones microbiológicas fueron cuantificadas en medio sólido específico para cada población. En este caso Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) es utilizado para las bacterias ácido-lácticas y Agar Papa Dextrosa (APD) para las levaduras. Los recuentos microbiológicos asumen que cada colonia está formada por una única célula, por lo tanto, los resultados son expresados en CFU/ml (unidades formadoras de colonias/mL). Cada muestra es cuantificada después de hacer diluciones decimales utilizando agua peptonada estéril a 0,1%. Las diluciones elegidas se colocan en las placas de MRS y APD. Las placas de MRS se incuban por 24-36 horas en una atmósfera semi aerobia a temperatura ambiente y las placas de APD se incuban por 48 horas o más, bajo condiciones aeróbicas a temperatura ambiente.

3.2.5 Densidad

La determinación de densidad se realizó utilizando un picnómetro, se pesa el picnómetro vacío, seco y a temperatura ambiente a continuación se llena completamente de la muestra (incluyendo el capilar de la tapa), se vuelve a pesar. Utilizando la diferencia de masas y el volumen teórico del picnómetro se puede calcular la densidad con la ecuación 3.2.

$$d = \frac{(M_{exp} - M_{pic})}{V_t} \quad (3.2)$$

Donde:

d : densidad de la muestra, g/mL.

M_{pic} : masa del picnómetro vacío, g.

M_{exp} : masa del picnómetro con la muestra, g.

3.2.6 Viscosidad

La determinación de viscosidad se realizó utilizando un viscosímetro de Ostwald, se llena el viscosímetro y utilizando una pera se obtiene el tiempo que tarda pasando de una marca a otra (el recorrido tiene un volumen específico asociado a la constante del viscosímetro). Utilizando el tiempo y la constante del viscosímetro se puede calcular la viscosidad con la ecuación 3.3.

$$v = \gamma * q \quad (3.3)$$

Donde:

v : viscosidad de la muestra, cSt.

γ : constante de viscosímetro, cSt/s.

q : tiempo del recorrido, s

3.3 Primera etapa experimental. Métodos de preservación de los granos de kéfir

Dos métodos de preservación se evaluaron para los granos de kéfir: congelado y secado. Se debe aclarar que los métodos de preservación solo se llevaron a cabo para los granos no comerciales (granos de kéfir frescos obtenidos localmente), debido a que los granos comprados comercialmente ya se encuentran preservados por medio de liofilización. Esto se realiza para mantener la viabilidad del cultivo iniciador fresco (granos de kéfir locales) a lo largo de toda la experimentación.

3.3.1 Congelado

Para el método de congelado, una muestra de 10 g de granos de kéfir es colocada en un contenedor de vidrio y cubierta con leche tratada a ultra alta temperatura (2% grasa) marca Dos Pinos; este contenedor es cerrado y colocado dentro de un congelador a una temperatura de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2 Secado

Para el método de secado los granos son inicialmente lavados con agua destilada estéril, a continuación 10 gramos de granos de kéfir son colocados dentro de un horno a una temperatura menor a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (para evitar la muerte de microorganismos) por 76 horas o hasta que la masa permanezca constante; esto se determina pesando la muestra varias veces hasta que la masa no disminuya más.

3.3.3 Modelo estadístico utilizado

Para esta parte se utilizó un modelo estadístico de comparación de medias en los pares de datos de cada corrida, para esto se utilizó la prueba t-student considerando varianzas constantes.

3.4 Activación y mantenimiento de granos

Todos los granos que se encuentran preservados (congelados, secado o liofilizado) deben ser activados antes de ser utilizados en las fermentaciones experimentales que se deben llevar a cabo en las siguientes etapas. Por lo tanto, el procedimiento descrito a continuación se llevará a cabo antes del inicio de todos los experimentos de fermentación.

3.4.1 Variables fijas

Para todas las fermentaciones en la etapa de activación y mantenimiento, se fijaron las siguientes variables esto para mantener la viabilidad de los granos de kéfir mientras estos sean necesarios.

- Temperatura ambiental ($25\text{-}26^{\circ}\text{C}$)
- Concentración de granos inicial de 25 g/L
- Tiempo 24 h y sin agitación

3.4.2 Procedimiento

Se inoculan los granos de kéfir en leche tratada a ultra alta temperatura (2% grasa) marca Dos Pinos dentro de un Erlenmeyer esterilizado se mantienen en este medio por 24 horas. Los granos son separados de la leche por medio de filtración y el mismo procedimiento es llevado a cabo por tres periodos de 24 horas; desde ese momento, los granos serán considerados como activados. Los granos se mantienen en estas condiciones, con intercambio de leche cada 24 horas, hasta que sean necesarios en las pruebas de fermentación.

3.5. Segunda etapa experimental. Comparación estadística entre tipos de granos

Para esta etapa de la experimentación se realizan tres repeticiones de fermentaciones de cada tipo de grano. El procedimiento al igual que las variables fijas durante la experimentación se explican a continuación. Esta etapa se realiza para corroborar la estabilidad del cultivo en términos de poblaciones microbiológicas, para comprobar que los resultados del diseño estadístico se mantendrán al utilizar granos comerciales o granos locales.

3.5.1 Variables fijas

- Temperatura 35 °C (T_f)
- Concentración de granos inicial de 27,5 g/L
- Tiempo 24 h
- Agitación: 50 rpm
- Erlenmeyer de 250 mL, con boca de 3 cm y diámetro inferior de 7,5 cm
- Leche Dos Pinos UHT 2% grasa
- Volumen de leche 200 mL

3.5.2 Modelo estadístico utilizado

Para esta parte se utilizó un modelo estadístico de comparación de medias en los pares de datos de cada corrida, para esto se utilizó la prueba t-student considerando varianzas constantes con $\alpha=0.05$, se compara el crecimiento porcentual de biomasa y el crecimiento en logaritmos de bacterias y levaduras, para esto se pesa la biomasa y se realizan recuentos antes y después de las fermentaciones.

3.5.3 Experimentos de fermentación

En la Figura 3.1 se describe el procedimiento general que se empleó para preparar, fermentar y hacer pruebas después de fermentar. Entre las etapas lo que cambia son los valores de temperatura, agitación y concentración granos/leche, estos cambios se indican al inicio de cada sección.

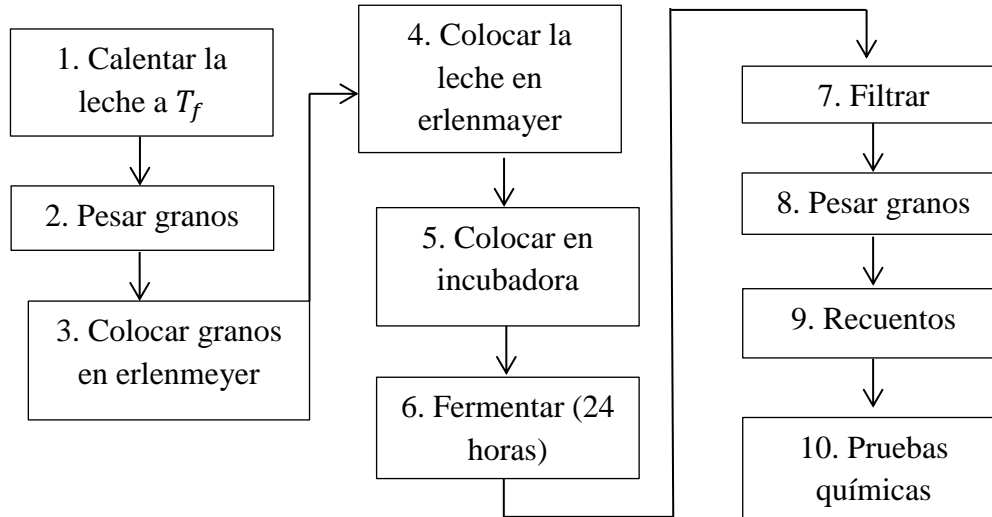


Figura 3.1 Diagrama del procedimiento general empleado para preparación, fermentación y realización de pruebas experimentales.

A continuación, se explican con más detalle los pasos del diagrama de la Figura 3.1.

Paso 1: la leche se calienta en un beaker utilizando una plantilla de calentamiento a la temperatura a la que se realizará la fermentación. La leche se abre dentro de una cámara de flujo laminar y se coloca dentro del beaker, este se tapa con papel aluminio y luego se coloca en la plantilla.

Paso 2: se pesan los granos con la ayuda de una balanza semi analítica.

Paso 3: dentro de una cámara de seguridad microbiológica con flujo laminar se colocan los granos dentro de los erlenmeyer estériles.

Paso 4: dentro de la cámara de flujo laminar se coloca la leche dentro de los erlenmeyer que contienen los granos pesados y se tapan los mismo con papel aluminio.

Paso 5: los erlenmeyer tapados se colocan en las rejillas de la incubadora con agitación orbital y se establecen la temperatura de fermentación y la agitación deseada.

Paso 6: se fermenta a las condiciones elegidas en el paso anterior por un tiempo de 24 horas.

Paso 7: se filtran los granos utilizando un colador de cocina que fue previamente esterilizado utilizando etanol a 70% y colocado por 10 min bajo luz ultravioleta dentro de la cámara de flujo laminar. La leche se coloca dentro de un erlenmeyer estéril y se tapa con aluminio, los granos

después de ser lavados con agua destilada estéril se dejan reposar encima de filtros de papel (para eliminar el agua superficial) luego se colocan dentro de un beaker estéril previamente pesado y se cubre con aluminio.

Paso 8: se pesa el beaker con los granos y se calcula la masa final por diferencia.

Paso 9: a la leche fermentada (kéfir) que se colocó dentro del erlenmeyer se le realizan los recuentos microbiológicos.

Paso 10: por último, al kéfir que se encuentra en el erlenmeyer se le realizan las pruebas químicas de determinación de proteína, determinación de lactosa y determinación de ácido láctico.

3.6 Tercera etapa experimental. Diseño central compuesto rotacional

Se realizan 24 experimentos de fermentación, siguiendo el procedimiento especificado en la Figura 3.1. Estos experimentos forman parte de un diseño experimental central compuesto rotacional con 6 puntos centrales, para asegurar la repetibilidad, con $\alpha=1.68$ lo que de la rotabilidad al diseño. En el Cuadro 3.3 se pueden observar los experimentos que se llevaron a cabo.

Cuadro 3.3 Diseño central compuesto rotacional, condiciones.

Orden	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Masa (g)
8	29	20	2,8
18	41	20	2,8
15	29	80	2,8
17	41	80	2,8
6	29	20	8,2
7	41	20	8,2
13	29	80	8,2
2	41	80	8,2
10	25	50	5,5
1	45	50	5,5
9	35	0	5,5
20	35	100	5,5
11	35	50	1,0
5	35	50	10
19	35	50	5,5
3	35	50	5,5
14	35	50	5,5
4	35	50	5,5
12	35	50	5,5
16	35	50	5,5

3.6.1 Variables fijas

- Volumen de leche 200 mL
- Erlenmeyer de 250 mL, con boca de 3 cm y diámetro inferior de 7.5 cm
- Leche Dos Pinos UHT 2% grasa

3.6.2 Variable de respuesta

Como variables de respuesta se documenta el cambio porcentual de la biomasa y el cambio en logaritmos en recuentos de bacterias ácido lácticas y levaduras. Para lo anterior se pesa la biomasa antes y después de las fermentaciones, y se realizan recuentos de bacterias y levaduras antes de después de las fermentaciones. Se debe aclarar que los recuentos antes de las fermentaciones se realizaron por triplicado para cada concentración de granos de kéfir una única vez debido a limitaciones en la cantidad de materia prima. Como medida adicional para control de calidad se hacen las pruebas químicas (3.2.2, 3.2.3 y 3.2.4).

3.7 Cuarta etapa experimental. Validación de los modelos obtenidos en la tercera etapa experimental.

En esta etapa se tiene como objetivo la validación de los modelos matemáticos obtenidos a partir del desarrollo del diseño central compuesto rotacional para las tres variables de respuesta.

3.7.1 Procedimiento

Para esta etapa se trabajó con el procedimiento de la Figura 3.1, utilizando las condiciones de temperatura (25 °C), agitación (100 rpm) y concentración de granos (5 g/L) obtenidas a partir de la maximización local (dentro de los límites del diseño estadístico) simultánea de los tres modelos.

3.7.2 Variable de respuesta

Se miden las mismas variables de respuesta que en la tercera etapa.

3.7.3 Modelo estadístico utilizado

Se realiza un análisis utilizando el método de Montecarlo sobre los modelos matemático que describen las variables de respuesta para obtener un rango de condiciones que simulen las condiciones operacionales reales del sistema.

3.8 Quinta etapa experimental. Cinética de crecimiento de granos y de producción de ácido láctico

Esta etapa tuvo como propósito obtener la constante de velocidad de crecimiento por medio de la ecuación logística y por medio de relaciones matemáticas la constante de velocidad de Monod. De igual manera se realiza la cinética de producción de ácido láctico.

3.8.1 Fermentaciones para determinación cinética

Se realizan fermentaciones, siguiendo el esquema de la Figura 3.1, utilizando las condiciones de temperatura, agitación y concentración de granos donde se maximizan las variables de respuesta (obtenidas en la tercera etapa experimental y validadas en la cuarta etapa experimental). Se analizan las muestras cada hora (para de esta manera completar la curva por un periodo de 36 horas).

3.8.2 Variable respuesta

Como variable respuesta se documenta el crecimiento porcentual de biomasa pesando la masa de los granos antes y después de las fermentaciones (3.2.1), de igual manera se realiza medición de acidez en ácido láctico de todas las muestras después de la fermentación (3.2.4).

3.8.3 Modelo estadístico utilizado

Se hace un análisis de regresión no lineal para obtener los valores de la constante de velocidad, concentración de granos máxima y concentración de granos inicial. De igual manera se realiza un análisis de regresión no lineal para obtener el valor de la constante de velocidad de producción de ácido láctico.

3.9 Última etapa experimental. Caracterización física del producto final.

Se realiza una última fermentación a las condiciones obtenidas en la tercera parte experimental a la que se le realizaron pruebas físicas de determinación de viscosidad y densidad y una última prueba química de determinación de pH.

3.9.1 Caracterización de muestras

En esta etapa se trabajó con una muestra, y siguiendo el procedimiento de la Figura 3.1, se realizó la fermentación por triplicado.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Caracterización de materia prima.

Se realizan las pruebas de caracterización de determinación de proteína, lactosa y ácido láctico a la leche que se utilizará a través de toda la experimentación. Los resultados se muestran en el Cuadro 4.1

Cuadro 4.1 Caracterización de materia prima

Ensayo	% proteína (%m/m)	% lactosa (%m/m)	% ácido láctico (m/m)
Resultado	3,29 ± 0,027	5,23 ± 0,16	0,150 ± 0,0044
Literatura *	3,2	5,2	0,12-0,18 ⁺

*Gómez & Mejía (2005), ⁺Villalobos (2006)

Las pruebas se realizaron por triplicado y se presentan con sus desviaciones estándar. Los resultados experimentales concuerdan en gran medida con los resultados encontrados en la literatura, por esta razón se pueden concluir que los métodos que se utilizan para las determinaciones químicas son adecuados.

4.2 Primera etapa experimental. Efecto del método de preservación.

Los tratamientos de preservación solo se realizaron a los granos de kéfir obtenidos localmente, ya que estos no se encuentran preservados de ninguna manera. Se desea obtener un tratamiento previo apto para preservación y mantenimiento de los mismo a lo largo de la duración del estudio.

Sin embargo, antes de aplicar cualquier método de preservación, se realizan recuentos microbiológicos de bacterias y levaduras en los cultivos iniciadores para analizar si existen diferencias estadísticas dentro de estas poblaciones. Para realizar esto se lleva a cabo el proceso de activación de los granos comerciales, posteriormente se hacen fermentaciones a las condiciones de activación para ambos tipos de granos; antes y después de la cual se hacen los recuentos microbiológicos y determinación de biomasa. Se debe aclarar que los resultados reportados son los promedios obtenidos después de tres corridas por tipo de cultivo y por tipo de población, se reporta el crecimiento en logaritmos. En el Cuadro 4.2 podemos ver los resultados obtenidos en los recuentos; de igual manera observamos la t student experimental y la teórica. Las t student

experimentales son menores que la teórica, de 1,53, para ambas poblaciones, bacterias y levaduras ($\alpha=0,05$ y $n_x + n_y - 2$ grados de libertad). Se concluye que las medias de ambas poblaciones pueden considerarse estadísticamente iguales o que no hay información que pruebe lo contrario.

Cuadro 4.2 Recuentos comparativos entre tipo de cultivo.

Población\Cultivo	Granos locales, log(cfu/ml)	Granos comerciales, log(cfu/ml)	t student
Levaduras	7,92 ± 0,002*	7,91 ± 0,002*	0,36
Bacterias	8,21 ± 0,03*	8,23 ± 0,03*	0,16

*se refieren a las desviaciones estándar de la prueba t.

Los granos locales fueron sometidos tanto al proceso de congelamiento como al secado para evaluar la supervivencia de las bacterias ácido-lácticas y las levaduras. El porcentaje de supervivencia de microorganismos para cada tratamiento se puede observar en la Figura 4.1.

De acuerdo con la literatura, durante el congelamiento y la activación de los granos de kéfir, la temperatura y la concentración de los granos son algunas de las variables que puede afectar el porcentaje de supervivencia microbiana dentro de la muestra (Chen et al, 2006). Para esta parte de la experimentación se utilizaron las mismas condiciones de activación, temperatura ambiente, sin agitación y con concentración de granos de 27,5 g/L y siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 3.1. En el caso del congelamiento la leche se utilizó como medio de preservación de igual manera es el medio de propagación.

La Figura 4.1. muestra como las bacterias ácido-lácticas tienen una mayor tasa de supervivencia después del congelamiento comparada con las levaduras. Esto se debe a que la recuperación de la pared celular cuando la leche es el medio de preservación durante el congelamiento es mayor, esto porque la leche tiene características que lo hacen un buen crioprotector (sustancia que es utilizada para proteger la pared celular del daño por congelamiento) (Kaewiad et al, 2016). Por otro lado, se ha reportado que las bacterias ácido-lácticas sobreviven los procesos de congelamiento mejor que los hongos y levaduras, a pesar de que los últimos también tiene una tasa de supervivencia considerable, esta es mucho menor que la obtenida por las bacterias (Bolla et al, 2010). Lo anterior puede atribuirse a la complejidad estructural de los hongos y las levaduras comparada con las bacterias. Adicionalmente, alguna literatura reporta que la tasa de congelamiento (velocidad a la

cual la temperatura baja) tiene un impacto mayor sobre la viabilidad de los hongos y las levaduras comparada con las bacterias (Ojha & Brijesh, 2016).

A la inversa, para el método de secado, la tasa de supervivencia fue mayor para las levaduras que aquella obtenida para las bacterias. Esto se pueden atribuir a la facilidad que tienen los hongos y las levaduras por encima de las bacterias a la adaptación a ambiente con poca humedad. Por otra parte, a pesar de que la temperatura de secado no excedió los 40 °C, la temperatura juega un papel importante ya que al someter a los granos a esta temperatura por largos periodos de tiempo causa el agotamiento de todo trazo de humedad en la muestra; esto puede causar daño a la pared celular y por lo tanto la recuperación de los microorganismos al reactivar los granos.

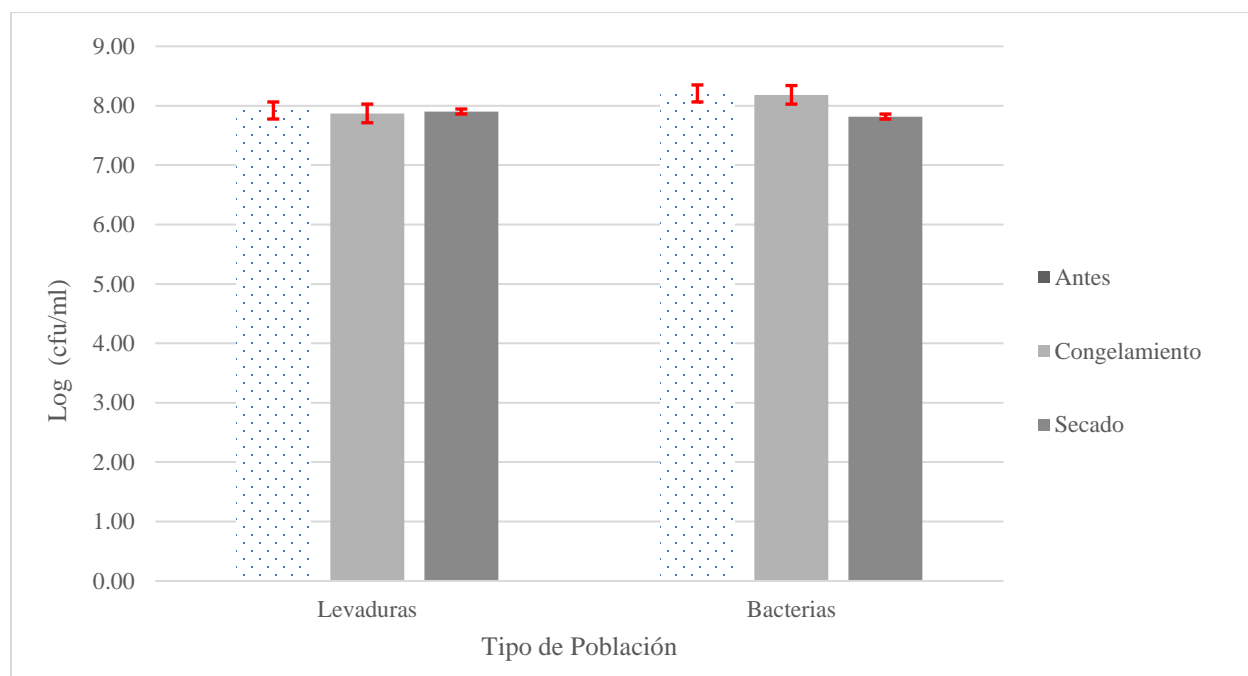


Figura 4.1 Supervivencia de microorganismos en los granos de kéfir locales antes y después de los métodos de preservación.

4.3 Segunda etapa experimental. Comparación estadística entre tipos de granos

Los resultados no muestran diferencias significativas ($\alpha=0,05$), en términos de crecimiento porcentual de biomasa ni en poblaciones finales de microorganismos; para los experimentos de fermentación llevados a cabo con los dos tipos de cultivo. El Cuadro 4.3 muestra los resultados obtenidos, la t de student experimental para el crecimiento de biomasa, bacterias y levaduras y

parámetros de calidad. El crecimiento biomásico es evaluado como un incremento porcentual obtenido entre las determinaciones antes y después de la fermentación. Se concluye que bajo las condiciones de operación a las que se llevaron a cabo las fermentaciones (3.5.1) ambos tipos de cultivo reaccionan de la misma manera. Esto porque los valores experimentales de la *t* student son menores que el teórico (1,53) para todas las variables de respuesta.

Cuadro 4.3 Comparación del desempeño de los tipos de granos.

-	Granos locales	Granos comerciales	t student
Levaduras, log(cfu/ml)	6,61 ± 0,06	6,63 ± 0,05	0,48
Bacterias y levaduras, log(cfu/ml)	13,55 ± 0,04	13,58 ± 0,06	1,01
Masa, %	7,20 ± 0,13	7,18 ± 0,20	0,19
Proteína (%m/m)	4,36 ± 0,06	4,35 ± 0,02	0,62
Lactosa (%m/m)	2,94 ± 0,11	2,92 ± 0,07	0,41
Ácido Láctico	1,22 ± 0,03	1,23 ± 0,01	0,44

4.4 Tercera etapa experimental. Diseño estadístico central compuesto rotacional.

En esta etapa se realizó un diseño estadístico para evaluar el crecimiento porcentual de biomasa y los crecimientos logarítmicos netos de bacterias y levaduras utilizando como factores la temperatura (°C), agitación (rpm) y concentración granos/leche (g/L). Los resultados obtenidos para el diseño presentado en la Sección 3.6 se pueden observar en el Cuadro A.7, se analizan los resultados utilizando el software Minitab Statistical Software Version 17 y se obtienen tres modelos matemáticos cuadráticos (que incluye interacciones entre variables) para la descripción del comportamiento de las tres variables de respuesta, estos se muestran en las ecuaciones 4.1, 4.2 y 4.3.

$$\%m = 380,6 - 15,8T + 0,21A - 21,97M + 0,17T^2 + 2,48 * 10^{-4}A^2 + 0,53M^2 - 2,57 * 10^{-3}TA + 0,39TM - 12,23 * 10^{-3}AM \quad (4.1)$$

$$\Delta \log(b) = 9,51 - 0,17T - 0,043A - 0,67M + 1,29 * 10^{-3}T^2 + 3,68 * 10^{-4}A^2 + 2,99 * 10^{-2}M^2 + 2,86 * 10^{-4}TA + 2,59 * 10^{-3}TM + 4,00 * 10^{-5}AM \quad (4.2)$$

$$\Delta \log(l) = 0,25 + 0,31T - 0,011A - 0,26M - 5,35 * 10^{-3}T^2 + 1,07 * 10^{-4}A^2 - 3,87 * 10^{-3}M^2 - 4,8 * 10^{-5}TA - 5,80 * 10^{-4}TM + 1,25 * 10^{-3}AM \quad (4.3)$$

Se obtuvo un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9988, 0,9420 y 0,9450 respectivamente para cada modelo, por lo tanto, se puede concluir que los datos se ajustan bien a los modelos propuestos.

Se obtiene el valor p para todas las variables en cada modelo, debido a que la significancia predefinida es 0,05 todo valor p menor o cercano a este valor predeterminado será tomado como significativo, según Pulido & Salzar (2008) todo valor p cercano a 0,1 podría considerarse como significativo. Para el modelo de crecimiento porcentual de biomasa se considera que las variables significativas son $A*M$ y $T*A$. Para el modelo de crecimiento logarítmico neto de bacterias se considera que las variables significativas son T , A y $M*M$. Por último, para el modelo de crecimiento logarítmico neto de levaduras se considera que las variables significativas son A y $T*T$.

Los modelos matemáticos obtenidos para cada variable de respuesta se verifican por medio de los supuestos de normalidad e independencia de los residuos. En la Figura 4.2 se muestran las gráficas de normalidad y se pueden comprobar los supuestos de normalidad de los tres modelos, ya que los residuos o puntos están cerca en la línea recta.

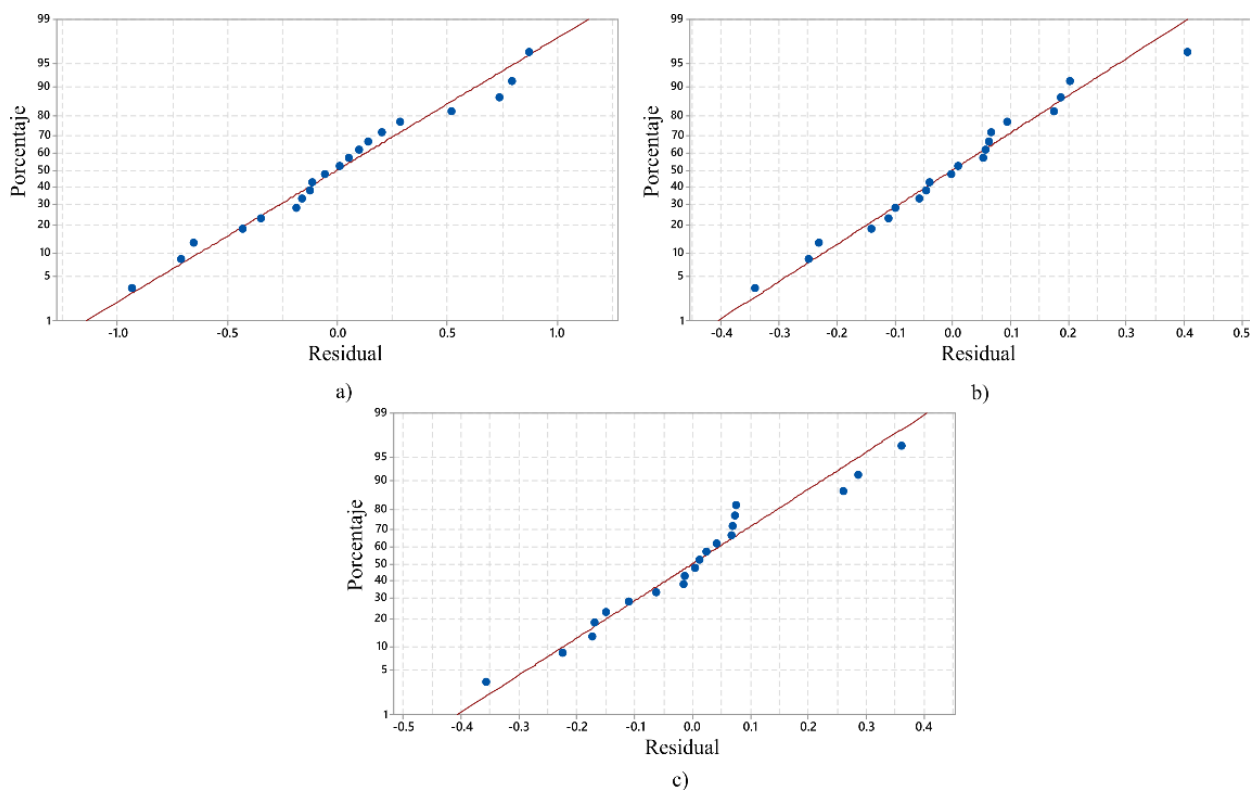


Figura 4.2 Gráficos de probabilidad normal para modelos de: a) crecimiento porcentual de biomasa, b) crecimiento logarítmico neto de bacterias y c) crecimiento logarítmico de levaduras.

En la Figura 4.3 se observa la independencia de los residuos para los tres modelos, se puede ver como los residuos se ubican aleatoriamente dentro de una banda horizontal y no siguen ningún patrón evidente en los gráficos de residuales versus orden de observación.

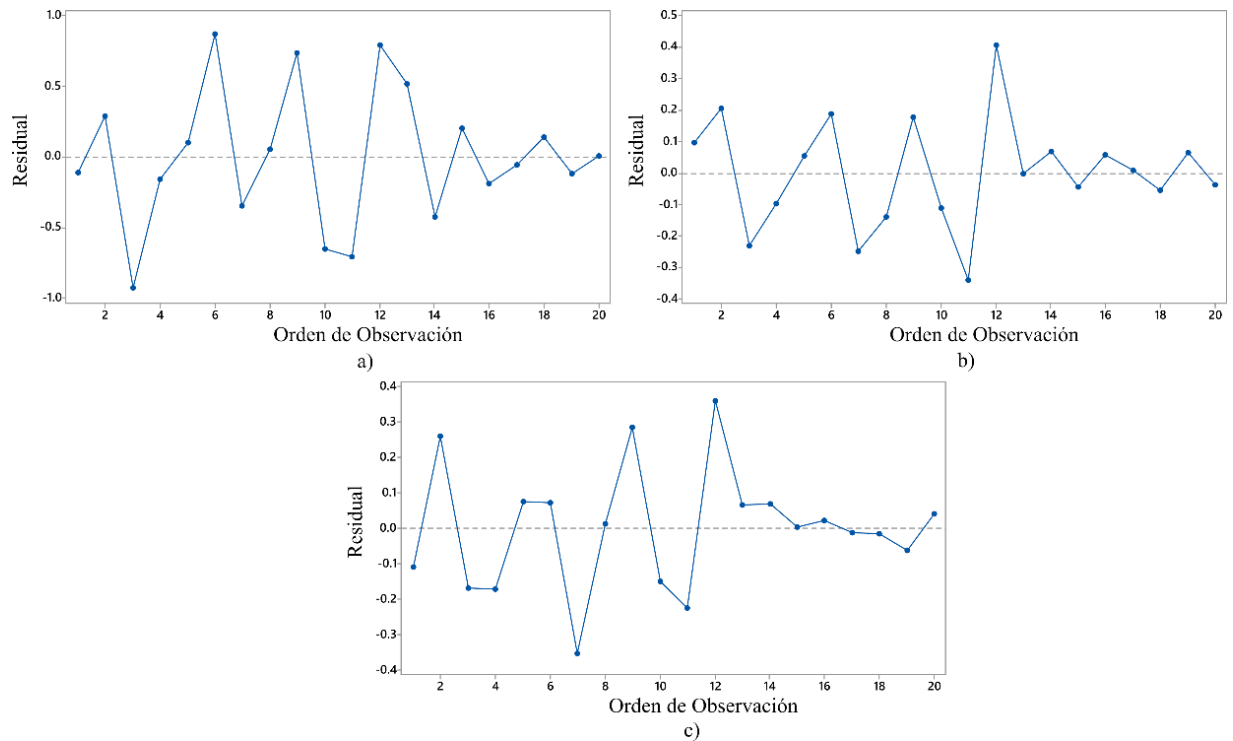


Figura 4.3 Gráficos de residual versus orden para modelos de: a) crecimiento porcentual de biomasa, b) crecimiento logarítmico neto de bacterias y c) crecimiento logarítmico de levaduras

A cada prueba del diseño estadístico central compuesto rotacional se le realiza una caracterización de propiedades químicas (proteína, lactosa y ácido láctico), los resultados se muestran en el Cuadro B.9. Se puede observar como para todos los experimentos se cumplen los mínimos estipulados por el Codex Alimentarius, por esta razón se pueden concluir que para los rangos de condiciones probados en la experimentación se cumplen los parámetros de calidad en cuanto a las características químicas.

Se obtiene nueve superficies de respuesta relacionadas a las tres variables de respuesta. Sin embargo, todas comparten una comunalidad, en todas las variables se obtienen mejores resultados para la menor concentración inicial de granos de kefir por volumen. Por esta razón a continuación se discutirán estas superficies de respuesta, aquellas obtenidas a la menor concentración inicial de granos de kéfir.

En la Figura 4.4 se puede observar como para el crecimiento porcentual de biomasa se obtiene una tendencia creciente conforme disminuye la temperatura al igual que una tendencia creciente, en menor medida, conforme aumenta la agitación. Donde se puede concluir que los mejores resultados se obtienen a menores temperaturas y mayores agitaciones.

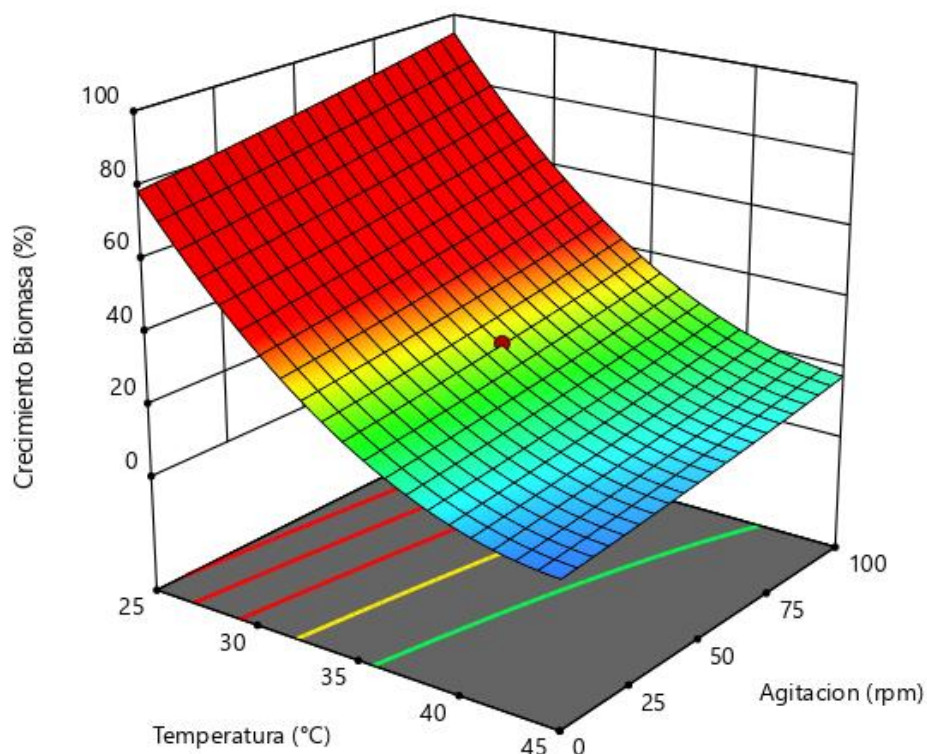


Figura 4.4 Superficies de respuesta del crecimiento porcentual de biomasa obtenida a la menor concentración inicial de gramos de granos de kéfir.

Para el crecimiento logarítmico neto de bacterias, como se puede observar en la Figura 4.5, se obtienen una tendencia creciente a lo largo del eje de temperatura donde se obtienen mejores resultados conforme la temperatura disminuye. Por otro lado, a lo largo del eje de la agitación podemos observar cómo se obtienen buenos resultados (de una magnitud relevante) cuando no se utiliza agitación al igual que cuando se utiliza una agitación considerable. Conforme la agitación aumenta la variable de respuesta disminuye hasta obtener un mínimo local, a partir de este momento la tendencia cambia y empieza a aumentar el valor de la variable de respuesta conforme aumenta la agitación. Se concluye que esto se debe a la presencia de varias especies de bacterias dentro de los granos de kéfir, y por lo tanto propagados a través del medio, de manera que algunas

de estas especies se desarrollan mejor cuando se opera a menores agitaciones y a medida que las revoluciones por minuto aumenta la cantidad de bacterias que se ven favorecidas a mayores agitaciones. Lo anterior puede explicarse por la presencia de especies heterofermentativas (no necesitan de oxígeno para reproducirse) al igual que de especies homofermentativas (necesitan de oxígeno para reproducirse), al no haber agitación hay menor transferencia de oxígeno en el medio y por lo tanto se favorecen las primeras y por lo contrario al aumentar la agitación estas se ven desfavorecidas hasta que se llega a un punto de agitación donde las segundas se ven favorecidas y empiezan a reproducirse.

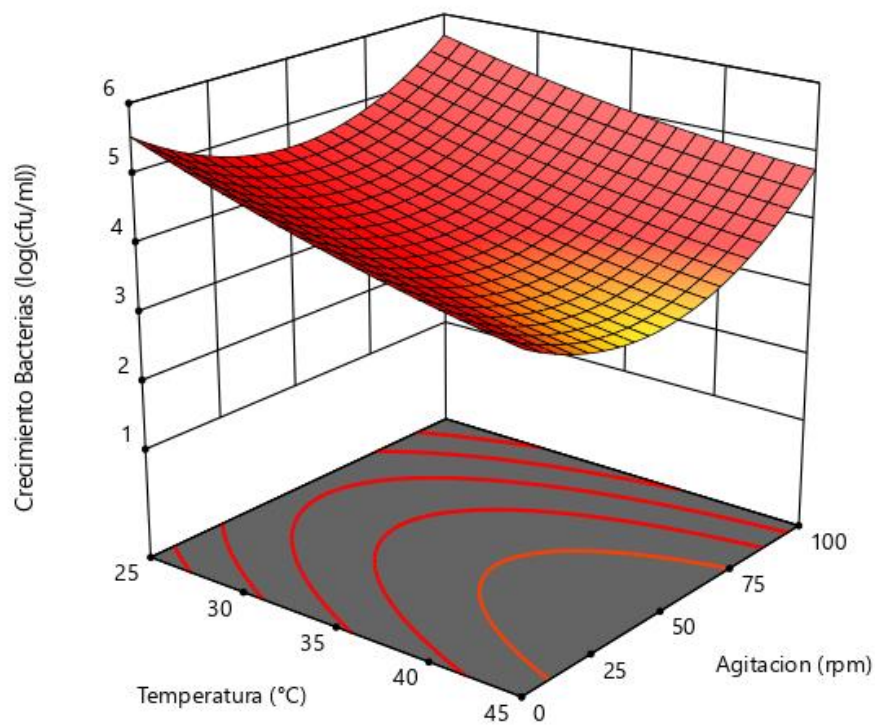


Figura 4.5 Superficies de respuesta del crecimiento logarítmico neto de bacterias obtenida a la menor concentración inicial de gramos de granos de kéfir.

Para el crecimiento logarítmico neto de levaduras (L), como se puede observar en la Figura 4.6, se obtiene un aumento de la variable de respuesta conforme se mueve de forma decreciente a lo largo del eje de temperatura hasta llegar a lo que parece ser una tendencia de línea recta, se puede concluir de esta manera que se obtiene un máximo global ya que la tendencia esperada al continuar disminuyendo la temperatura sería una disminución del valor de la variable de respuesta. Por otro

lado se puede observar la misma tendencia descrita anteriormente para el crecimiento logarítmico de bacterias donde a menores agitaciones hay un punto máximo de la variable de respuesta la cual disminuye conforme aumenta la agitación hasta llegar a un valor mínimo y a continuación comienza a aumentar. Se puede observar que la tendencia no es tan marcada como aquella que se obtiene para la variable de respuesta anterior, de igual manera se puede distinguir y se concluye que se debe a las mismas razones.

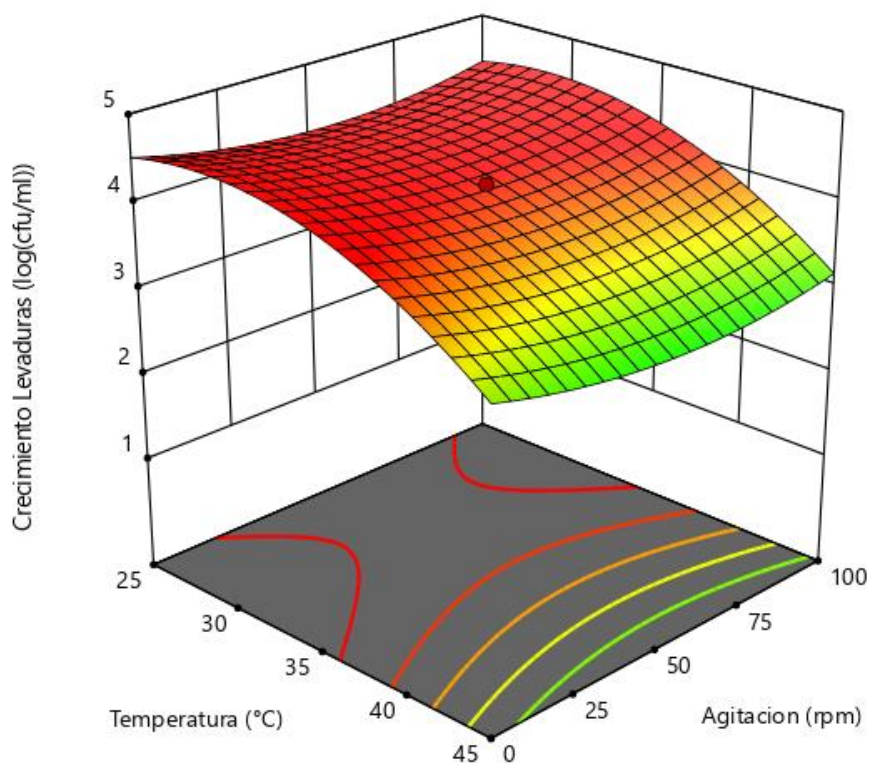


Figura 4.6 Superficies de respuesta del crecimiento logarítmico neto de levaduras obtenida a la menor concentración de gramos de granos de kéfir.

4.5 Cuarta etapa experimental. Maximización estadística de las variables de respuesta

Una vez que se obtienen los modelos matemáticos del diseño estadístico y se comprueban su normalidad e independencia se realiza una maximización local de las variables de respuesta simultáneamente, esto quiere decir que se maximiza la respuesta de todas las variables de respuesta para así obtener las condiciones (temperatura, agitación y concentración de granos) a las que esto se puede lograr. Lo anterior se realiza con el objetivo de comprobar el modelo, una vez obtenidas las condiciones a las que se maximizan las variables se realiza un último experimento a estas

variables para validar que efectivamente se maximizan las variables y que los valores obtenidos se encuentran dentro de los intervalos de respuesta para un 95% de confianza.

En el Cuadro 4.4 se pueden observar los resultados de la maximización simultánea, se observa cómo para el crecimiento logarítmico de bacterias y levaduras el intervalo de confianza (que muestra el rango de la variable de respuesta que se obtendrá a las condiciones maximizadas con 95% de confianza) es amplio en comparación al obtenido para el crecimiento porcentual de biomasa a pesar de haber obtenido un error menor a este. A pesar de lo anterior los valores de los intervalos para el crecimiento de bacterias y levaduras siempre cumplen con los valores de calidad que propone la FAO/WHO (2011), Cuadro 2.2. Si se desea comparar con el Cuadro 2.2, se debe aclarar que el crecimiento logarítmico neto es la diferencia entre el logaritmo de unidades formadoras de colonias antes y después de la fermentación, se debe tomar en cuenta que para una concentración de 5 g/L el logaritmo de unidades formadoras de colonias antes de la fermentación es de 3,34 y 3,09 para bacterias y levaduras respectivamente.

Cuadro 4.4 Resultados de la maximización simultánea de las variables de respuesta obtenidas con el software y en experimentación.

Variables de respuesta	Resultados Software			Resultado Experimentación
	Ajuste	Error del ajuste	Intervalo de confianza al 95%	
Crecimiento porcentual biomasa (%)	94,48	1,48	(91,18; 97,79)	93,60±9,40E-03
Crecimiento logarítmico de bacterias (log(cfu/mL))	5,678	0,527	(4,504; 6,853)	5,01 ±2E-03
Crecimiento logarítmico de levaduras (log(cfu/mL))	4,435	0,527	(3,261; 5,610)	5,43 ± 0.04

En la Figura 4.7 se puede observar gráficamente el proceso de maximización simultánea para las tres variables de respuesta, las condiciones donde se maximizan las variables de respuesta son a una temperatura de 25°C, agitación a 100 rpm y concentración de granos de 5 g/L. Observando la figura se pueden concluir dos cosas a simple vista: primero que la maximización obtenida es

únicamente local debido a la tendencia que tienen las curvas (en específico para el factor de agitación), las mismas tienen tendencia a crecer al aumentar la agitación y segundo que al tratarse de una maximización simultánea (de tres factores y tres variables de respuesta) no se maximizan completamente algunas variables, por ejemplo, podemos observar como a 100 rpm no se obtiene el máximo de levaduras, a pesar de esto se obtiene un número muy cercano al máximo (que se obtiene a 0 rpm).

A parte de tener como objetivo la maximización de las variables de respuesta se debe tener presente que la idea general de obtener la gráfica anterior es la maximización de los recursos energéticos. La reacción es auto catalítica y sabiendo que el producto de interés en este estudio es el kéfir líquido y la calidad de este (no precisamente la biomasa), no es necesario la obtención maximizada del porcentaje de crecimiento de biomasa, por esta razón podríamos eliminar la variable de crecimiento porcentual de biomasa como una variable objetivo para la maximización. Los mínimos estipulados por la FAO/WHO en logaritmos de unidades formadoras de colonias (log(cfu/g)) para bacterias y levaduras se encuentran por debajo de los valores obtenidos en la maximización gráfica cuando el valor de agitación es 0 rpm, por lo que se puede concluir que inclusive a 0 rpm siempre se van a cumplir los requisitos de calidad en lo que respectan bacterias y levaduras para cualquier condición de agitación (entre 0-100 rpm).

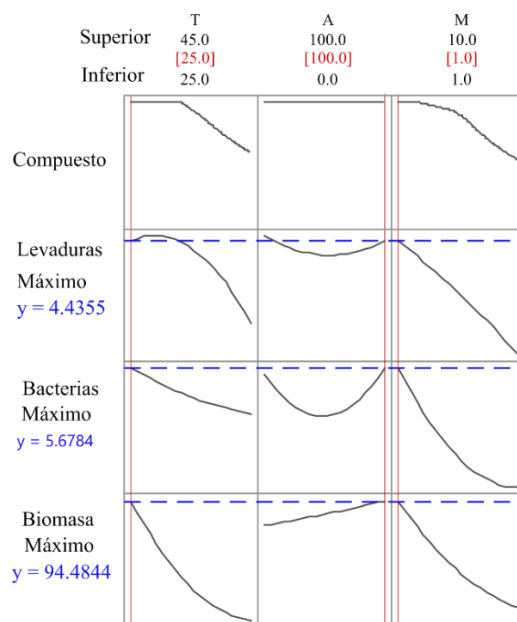


Figura 4.7. Optimización gráfica simultánea para las tres variables de respuesta.

Debido a que los beneficios de llevar a cabo la operación a 100 rpm son menos relevantes que los beneficios energéticos de llevar a cabo la operación a 0 rpm se decide llevar a cabo la optimización con un valor fijo de agitación a 0 rpm, obteniendo los resultados mostrados en el Cuadro 4.5. El porcentaje de crecimiento de la biomasa sigue siendo alto, por cada gramo de granos de kéfir se obtendrán 0,788 gramos de granos nuevos, el crecimiento logarítmico neto de bacterias disminuyó en poca cantidad, pero sigue cumpliendo con los límites de calidad estipulados por la FAO/WHO y por último el crecimiento logarítmico neto de levaduras aumento en poca cantidad y de igual manera cumple con los límites de calidad.

Cuadro 4.5 Resultados de la maximización con agitación fija a 0 rpm.

Variables de respuesta	Ajuste	Error del ajuste	Intervalo de confianza al 95%
Crecimiento porcentual biomasa (%)	78,75	1,48	(75,45; 82,05)
Crecimiento logarítmico de bacterias ($\Delta\log(\text{cfu/mL})$)	5,542	0,527	(4,367; 6,716)
Crecimiento logarítmico de levaduras ($\Delta\log(\text{cfu/mL})$)	4,527	0,527	(3,352; 5,701)

4.6 Quinta etapa experimental. Cinética.

4.6.1 Cinética de crecimiento de biomasa

En esta etapa se realiza la curva de crecimiento de biomasa para las condiciones de optimización obtenidas en la parte anterior, utilizando un valor de agitación de 100 rpm. Se obtienen los datos de concentración de granos contra tiempo que se observan en la Figura 4.8 representados como puntos, donde cada punto representa el promedio de tres repeticiones. Se utiliza el software Curve Expert Basic 2.0 para obtener el ajuste para la ecuación logística (línea roja), modelo fácilmente relacionable con una velocidad específica de crecimiento como se explica en la sección 2.6, este ajuste al igual que los datos experimentales se puede observar en la Figura 4.8.

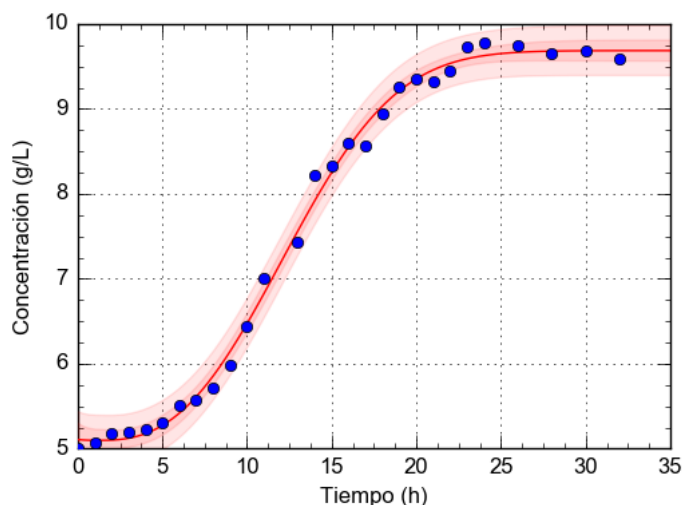


Figura 4.8 Cinética de la producción de biomasa.

Se obtienen los parámetros de cinética para la ecuación de Weibull modificada utilizando el software Curve Expert Basic 2.0 que se muestran en el Cuadro 4.6.

Cuadro 4.6 Parámetro de la cinética de crecimiento de biomasa para de Weibull modificada.

Parámetro	Valor	Error estándar
B_{max} (g/L)	9,70	1,6E-04
k (h ⁻¹)	0,029	2,65E-04
B_i (g/L)	4,58	5,25E-07
t_a (h)	2,36	7,79E-05
z (adim)	2,89	
R^2	0.9957	-

Se obtiene una concentración máxima de 9,70 g/L de biomasa, una constante de crecimiento de biomasa de 0,029 h⁻¹ y una concentración inicial de biomasa de 4,58 g/L. Se puede observar como este modelo predice una concentración máxima mayor que aquella obtenida experimentalmente, al igual que una concentración menor que la utilizada experimentalmente, de igual manera la constante obtenida predice que por cada gramo de granos de kéfir se producirán 0,029 gramos por cada hora de fermentación. Según Zajsêk & Gorsêk (2010) la constante de crecimiento de biomasa obtenida por medio del modelo logístico es de 0,042 h⁻¹ utilizando una concentración inicial de granos de kéfir de 42 g/L a 21 °C y leche de vaca entera.

Resultados similares a aquellos citados por Tramsêk & Gorsêk (2008) que utilizan el modelo de Richards obteniendo una constante de crecimiento de 0,0167 h⁻¹, con leche de vaca entera tratada a ultra alta temperatura a 24 °C, agitación a 90 rpm, una concentración inicial de granos de kéfir

de 75 g/L, y con glucosa adicional a una concentración inicial de 20 g/L. Se puede establecer que llevando el proceso con una menor cantidad de biomasa el incremento de masa por unidad de tiempo es mayor.

4.6.2 Cinética de producción de ácido láctico

A todos los experimentos se les determinó la acidez titulable de manera que se obtuvo un gráfico de concentración de ácido láctico producido contra tiempo (línea azul). Para lograr lo anterior se resta el valor de ácido láctico a los resultados para que la gráfica contenga únicamente el ácido producido desde una concentración igual a cero. Utilizando la ecuación de Gompertz y el software Polymath 6.0 (debido a que el software Curve Expert Basic 2.0 no tiene el modelo de Gompertz modificado que se utiliza en este caso). Se obtiene la Figura 4.9, donde se puede ver el ajuste (línea verde). Al comparar la Figura 4.8 y 4.9 se puede observar como las zonas de adaptación coinciden, es hasta que las células se adaptan al ambiente que se empiezan a sintetizar productos (alrededor de la hora 9-10).

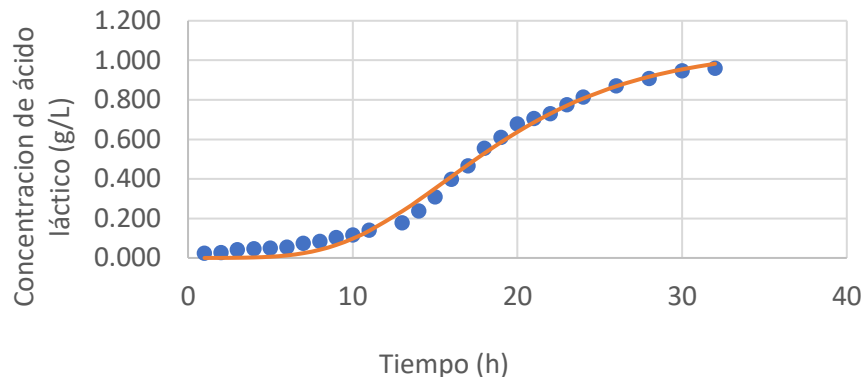


Figura 4.9 Cinética de la producción de ácido láctico.

Se obtienen los parámetros de cinética de producción de ácido láctico para el modelo de Gompertz utilizando el software Polymath 6.0, estos se muestran en el Cuadro 4.7.

Cuadro 4.7 Parámetros de la cinética de producción de ácido láctico para modelo de Gompertz.

Parámetro	Valor	Error estándar
$C_{max,ac}$ (g/L)	1,066	0,082
r_{ac} (g/Lh)	0,060	0,006
t_a (h)	9,16	0,78
R^2	0,991	

Se obtiene una concentración máxima de 1,066 g/L de ácido láctico, una constante de producción de ácido láctico de 0,060 g/Lh y un tiempo de adaptación de 9,16 horas. Con los datos recolectados de formación de biomasa y producción de ácido láctico se puede calcular el rendimiento de la zona exponencial de formación de producto, el valor de este sería 0,201 g_{ac}/g_{bm} .

4.7 Última etapa de caracterización.

En esta etapa se realizó la medición de las propiedades fisicoquímicas, densidad, viscosidad y pH, del kéfir producido a las condiciones de 25°C, 100 rpm y 5 g/L (condiciones donde se maximiza la producción de biomasa, bacterias y levaduras) y de la leche utilizada como materia prima en su producción, estas propiedades se encuentran en el Cuadro 4.8. Se refleja, como es de esperar, que el pH del kéfir es menor que aquel obtenido para la leche debido a que en la fermentación se produce ácido láctico. La viscosidad aumenta casi en 5 veces debido a la formación de kefiran, sustancia con consistencia de gel producida por las bacterias presentes en el kéfir. Este aumento en la viscosidad también es debido al aumento de la acidez que provoca cambios estructurales en la proteína de la leche y como consecuencia hay un aumento en la viscosidad. Por último, la densidad del kéfir es un poco mayor que aquella de la leche, esto puede deberse al cambio de estado del líquido ya que la formación de kefiran afecta la viscosidad de este.

Cuadro 4.8 Propiedades de la leche y el kéfir medidas a 25 °C.

Producto	pH	Viscosidad (cP)	Densidad (g/mL)
Leche	6,6433 ± 0,0058	2,2427 ± 0,0201	1,0545 ± 0,0002
Kéfir	4,3267 ± 0,0058	14,5867 ± 0,1531	1,0568 ± 0,0001

4.8 Simulación de Monte Carlo.

Se simula, utilizando el método de Monte Carlo, la variación de las condiciones del proceso ya sea debido a cambios ambientales o simplemente a variaciones de estas debido a fallos en el equipo, esto para obtener una distribución de los resultados más probables. La simulación se realiza para la variable de respuesta de crecimiento logarítmico neto de levaduras, ya que es la variable que podría quedar debajo de las recomendaciones del Codex Alimentarius esto se puede observar en la Figura 4.7. Se utiliza entonces el modelo matemático de crecimiento logarítmico neto de bacterias y se simulan variaciones en las condiciones de temperatura, agitación y concentración. Se simulan varios escenarios que se explicaran a continuación

4.8.1 Primer escenario

Utilizando las condiciones óptimas obtenidas en la cuarta etapa (25°C, 100 rpm y 5 g/L de granos de kefir), se realiza la primera simulación para obtener cual va a ser el rango de respuesta más probable si hay variaciones de estas condiciones durante el proceso. Debido a que el clima de Costa Rica es tropical con temperaturas que rondan entre 20-30 °C y el proceso se llevará a cabo a temperatura ambiente, se programa una variación de 20 °C a 30 °C utilizando una distribución uniforme. La agitación ideal es de 100 rpm, pero debido a que la viscosidad del producto aumenta, esta puede verse afectada, se programa una variación utilizando una probabilidad normal de 95 a 105 rpm. Por último, la concentración inicial se varía entre 2,5 g/L y 7,5 g/L.

Se obtiene la Figura 4.10 donde se puede observar una distribución normal de la variable de respuesta, se asegura que con las variaciones explicadas anteriormente la probabilidad más alta es que la respuesta se encuentre entre 4,2 y 4,5 log(cfu/mL), con una media de la respuesta de 4,30 ±0,19 log(cfu/mL). Considerando que el logaritmo de levaduras iniciales para las condiciones óptimas es de 3,05, se obtienen más de 7 log(cfu/mL) de levaduras cumpliendo el requerimiento mínimo propuesta por el Codex Alimentarius.

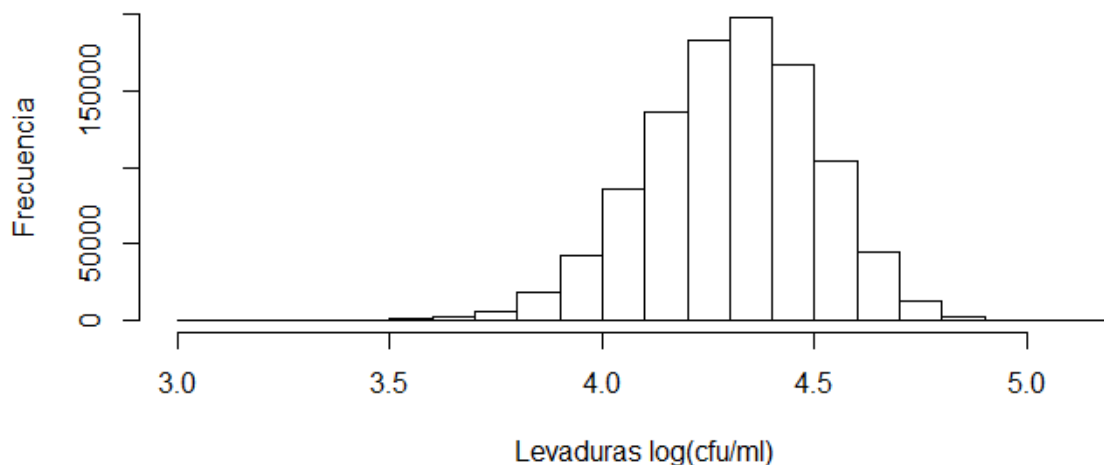


Figura 4.10 Distribución de probabilidad del crecimiento logarítmico neto de bacterias para el primer escenario.

4.8.2 Segundo escenario

En la cuarta etapa se considera la opción de realizar la operación sin agitación (0 rpm) ya que se cumplen los requerimientos de poblaciones microbianas en el producto final y se eliminaría el costo de llevar a cabo la operación a 100 rpm. Se varían la temperatura y la concentración inicial de la misma forma que en el escenario anterior. La mezcla no se agitaría, pero debido a que podría haber algún tipo de perturbación se programa una variación con distribución uniforme de 0 a 1 rpm.

Se obtiene la Figura 4.11 donde se puede observar lo que se considera una distribución normal de la variable de respuesta, donde se puede establecer que con las variaciones explicadas anteriormente la probabilidad más alta es que la respuesta se encuentre entre 4 y 4,6 logaritmos netos de crecimiento, con una media de la respuesta de $4,32 \pm 0,30$ log(cfu/mL). Por lo tanto, podemos concluir que con las variaciones de las condiciones del proceso propuestas y con un logaritmo neto de levaduras inicial de 3,05, se logra obtener más de 7 log(cfu/mL) de levaduras al final de la fermentación cumpliendo el requerimiento mínimo propuesto por el Codex Alimentarius.

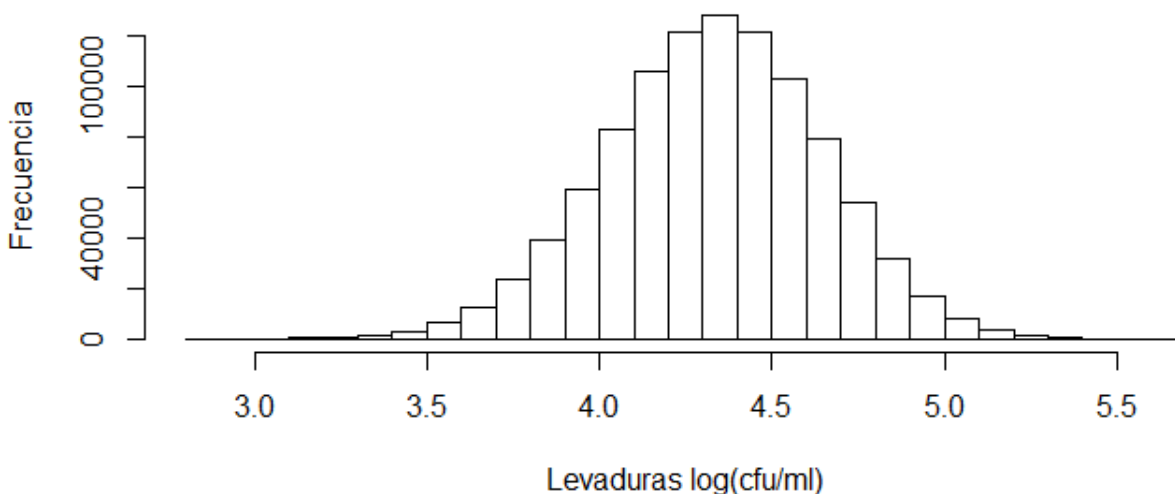


Figura 4.11 Distribución de probabilidad del crecimiento logarítmico neto de bacterias para el segundo escenario.

4.9 Modelo de negocio: etapa desarrollada con AUGE.

Se trabaja con AUGE en la redacción y conceptualización del modelo de negocios. Primero se realiza el descubrimiento del cliente, segundo el diseño de la solución y tercero la propuesta de valor.

4.9.1 Descubrimiento del cliente

Dentro de la primera etapa se realiza la segmentación de mercados la cual permite enfocar el emprendimiento siempre teniendo presente que no se deben caer en las trampas de hacer segmentaciones únicamente por edad, género y localización. Se realiza una segmentación global utilizando usuarios específicos, mostrada en Anexos, a partir de esta se seleccionan tres mercados con los que se van a trabajar. Con base en estos se realiza un mapa de empatía para cada uno donde se caracteriza al segmento como si fuera una persona, mostrados en Anexos, esta selección se realiza pensando en los mercados que pueden ser adoptadores tempranos; personas entusiastas de probar y utilizar nuestra solución a sus problemas. Podemos ver como se logra realizar un mapa de empatía donde podemos definir con facilidad las actividades diarias que realizan estos tres

segmentos que permitan que nuestro producto se introduzca en sus vidas diarias. A continuación, se estima el tamaño del mercado, que podemos ver en Anexos, donde evaluamos si realmente estamos ante una oportunidad de negocio con impacto. Podemos ver que después de realizar el ejercicio para uno de los segmentos, podríamos concluir que el tamaño del mercado costarricense en lácteos es lo suficientemente interesante para introducir un producto y además tiene suficiente tamaño para que tenga potencial de escalabilidad.

Por último, se realiza una validación de los supuestos realizados en las actividades anteriores donde por medio de conversaciones y la realización de una encuesta se indaga sobre los posibles comportamientos ante un problema. Se logran validar los supuestos realizados sobre comportamientos, necesidades y tamaño de mercado.

4.8.2 Diseño de la solución

En esta etapa se trabaja en la definición del producto que corresponden directamente a las necesidades identificadas para el segmento previamente definido. Primero se realizan los trabajos por hacer (job to be done) donde se intenta entender más de cerca las necesidades del cliente. El

ejercicio se puede observar en Anexos, en este se ilustra como los trabajos requeridos por el cliente son los que configuran el enfoque de nuestra solución y por ende el diseño y definición de nuestro producto.

Se realiza un Journey Map (Mapa de experiencia) que se puede observar en Anexos donde se descubre la trayectoria que recorre el cliente desde que se percate de su necesidad u obtiene la motivación para adquirir el producto hasta las conclusiones de este, para poder identificar los puntos donde nuestro producto en comparación con otros puede llegar a llenar un vacío.

4.8.3 Propuesta de valor

Se realiza una declaración simple y clara que explica cuál es la configuración de nuestro producto para generar el mejor beneficio para el cliente y que logra destacarse de las demás alternativas. Se logra conectar (la información de las actividades anteriores) la solución que proporciona nuestro producto con las necesidades del cliente.

Por otro lado, se realiza un gráfico de posición competitiva donde se puede visualizar mejor el valor que tiene nuestro producto a la par de los productos similares en el mercado. Se excluye “precio” como característica o requerimiento a comparar ya que se asume que el precio será competitivo y que no es una limitante dentro de lo mercados seleccionados. En este se comparan los niveles de proteína y la cantidad de probióticos, se puede observar el gráfico en Anexos.

El último hito de este segmento es ofrecer el producto a algún cliente, ver si hay personas interesadas en la compra del producto y documentar las conclusiones, críticas y comentarios que se tenga sobre el mismo. Una limitante en este punto es la falta de permisos sanitarios para la venta del producto en establecimientos, pero se manifestó interés de dos restaurantes/caféterías saludables en comprarlo.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El método de preservación más apto para la preservación de la población microbiológica dentro de los granos de kéfir es el congelamiento que preserva más del 89% de la población de levaduras y bacterias dentro de los mismos.
- Se encontró que no hay diferencia estadística entre los cultivos iniciadores utilizados, en términos de poblaciones microbiológicas ni crecimiento de biomasa bajo las mismas condiciones de fermentación, de esta manera se concluye que ambos cultivos iniciadores son aptos para la producción de un producto que cumpla los parámetros de calidad para el kéfir.
- Se logra maximizar y validar los modelos matemáticos obtenidos a partir del diseño estadístico central compuesto rotacional, obteniendo así las condiciones adonde se obtiene mayor cantidad de biomasa, levaduras y bacterias dentro de los límites estudiados.
- En términos prácticos es posible llevar a cabo el proceso maximizado, sin utilizar agitación (0 rpm), y aun así obtener un porcentaje de crecimiento de biomasa alto y cumplir con los estándares de calidad en los conteos de poblaciones microbiológicas.
- Se prueban métodos de determinación de propiedades químicas (proteína, lactosa y ácido láctico) para cuantificar estas propiedades y verificar que se cumplan estos parámetros de calidad a través de todo el proceso.
- Se obtiene que a través del desarrollo del diseño experimental se cumplen los parámetros de calidad de características químicas (proteína, lactosa y ácido láctico), se obtienen porcentajes de proteína entre 3,95-4,47 %, porcentajes de ácido láctico entre 0,96-1,41 % y porcentajes de lactosa entre 2,35-3,19 %.
- A través de la caracterización fisicoquímica del producto final y de la leche (materia prima) se logran visualizar las diferencias y comparar la densidad, viscosidad y pH antes de después de la fermentación y relacionar estos cambios con los procesos de metabolización de las bacterias y levaduras dentro de los granos de kéfir.

- Se obtiene la constante de crecimiento de biomasa ($0,0290 \text{ h}^{-1}$) y la tasa de producción de ácido láctico ($0,060 \text{ g/Lh}$) para de esta manera obtener el rendimiento de producción de ácido láctico de los granos de kéfir ($0,201 \text{ g}_{ac}/\text{g}_{bm}$).
- Al realizar los ejercicios de modelo de negocio se logra entender al cliente, valorar el producto y cuantificar el mercado, concluyendo que el mercado de lácteos en Costa Rica es apto (en tamaño y en valor) para el desarrollo de un producto lácteo funcional.
- Por último, se decide continuar el proceso de incubación para desarrollar un modelo de negocio enfocado en crear un producto lácteo funcional que promueva el bienestar (físico, mental en integral) dirigido a la regulación de los síntomas y prevención de problemas digestivos crónicos relacionados y no relacionados con la intolerancia a la lactosa. Diferenciando al producto por su alto contenido probiótico, alto contenido de proteínas y bajo contenido de azúcar agregado.

5.2 Recomendaciones:

- Siendo el kéfir un producto vivo que ocupa de condiciones ideales para crecer se recomienda realizar un estudio con límites de agitación más amplios debido a la tendencia creciente que muestran las variables de respuesta al aumentar la agitación.
- Debido a que los granos de kéfir están formados por una gran cantidad de bacterias y levaduras se recomienda realizar una caracterización de estas para saber cuáles son las que componen ambos tipos de granos utilizados en el presente estudio y realizar una comparación de estas.
- En este estudio se realiza la cinética de crecimiento de biomasa, no obstante, sería de interés saber cómo crecen las poblaciones de bacterias y levaduras (como un todo y cada especie por separado) para de esta manera obtener constantes de crecimiento de las poblaciones microbiológicas.

CAPÍTULO 6

NOMENCLATURA

Mayúsculas

B: concentración de biomasa, g/L

C: concentración g/L

K: concentración limitante, g/L

M: masa, g

P: concentración de producto, g/L

Q: constante de crecimiento de Monod, h⁻¹

S: concentración de sustrato, g/L

V: volumen, L

Minúsculas

bm: referente a biomasa

d: densidad, g/ml

f: factor de corrección, adim.

k: constante de crecimiento h⁻¹

q: tiempo de recorrido, s

r: tasa de producción, g/Lh

t: tiempo, h

v: *viscosidad cSt*

z: *constante de forma, adim.*

Símbolos

γ : constante del viscosímetro, cSt/s

μ : velocidad de crecimiento de Monod, g/Lh

β : constante de crecimiento de Monod, h⁻¹

Subíndices

a: referente a adaptación

ac: referente a ácido láctico

d: referente a densidad

exp: referente a experimental

f: referente a final

g: referente a granos de kéfir

i: referente a inicial

kef: referente a kéfir

l: referente a leche

lac: referente a lactosa

m: referente a muestra

max: referente a máximo

pic: referente a picnómetro

s: referente a sustrato

T: referente a total

tit: referente a titulación

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Aragon G., Graham D., Borum M. & Doman D. (2010). *Probiotic therapy for irritable bowel syndrome*. *Gastronomy and Hepatology*, 6(1): 39-44. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567539>
- Arslan S. (2014). *A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir*. *CyTA Journal of Food*, 13(3): 340-345. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.981588>
- Bolla P., Serradell M., Urraza P. & Antoni G. (2010). *Effect of freeze drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir*. *Journal of Dairy Research*, 78: 15-22. <https://doi.org/10.1017/S0022029910000610>
- Brooks G., Carroll K., Butel J., More S. & Mietzner T. (2013). *Jawetz, Melnick & Adelbergs Medical Microbiology*. Edición 26. McGraw Hill Lange, United States.
- Brown A. & Valiere A. (2004). *Probiotics and Medical Nutrition Therapy*. *Nutrition and Clinical Care*, (2): 56-68. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15481739>
- Chen H., Lin C. & Chen M. (2006). *The effects of freeze drying and rehydration on survival of microorganisms in kefir*. *Asian-Australian journal of Animal Science*, 19(1): 126-130. <https://doi.org/10.5713/ajas.2006.126>
- Dirección General de Normas Mexicanas. (1982). *NMX-F-420: Productos alimenticios para uso humano, determinación de acidez en leche*. Subsecretaría de Salubridad.
- FAO/WHO (2011). *Codex Alimentarius: Milk and milk products*. Second Edition. World Health Organization and Food and Agriculture Organization.
- Fogler S. (2008). *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. Cuarta Edición. Pearson Education, México.
- Gómez D. & Mejía O. (2005). *Composición nutricional de la leche de ganado vacuno*. *Revista Lasallista de investigación*, 2(1): 38-42. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69520107>
- Heyman M. (2006). *Lactose intolerance in infants, children and adolescents*. *American Academy of Pediatrics*, 118(3): 1279-1286. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1721>
- Huseini H., Rahimzadeh G., Fazeli M., Mehrazma M. & Salehi M. (2012) *Evaluation of wound healing activities of kefir products*. *Journal of the International Society of Burn Injuries*, 38: 719-723. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.12.005>

- Howarth G. & Wang H. (2013). *Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health*. *Nutrients Journal*, 5:58-81. <https://doi.org/10.3390/nu5010058>.
- Instituto Adolfo Lutz (2008). *Métodos físicoquímicos para análisis de alimentos*. Cuarta Edición.
- International Standard. (2014). *ISO 8968-1: Milk and Milk Products, Determination of nitrogen content*. ISO and IDF.
- Isolauri E., Kirjavainen V. & Salminen S. (2002). *Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation*. *Gut*, 50:54-59. https://doi.org/10.1136/gut.50.suppl_3.iii54
- Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanhu J. & Mingsheng D. (2009). *Analysis of the microbiota in Tibetan kefir grains using gel electrophoresis*. *Journal of Food Microbiology*, 26: 770-775. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.009>
- Kaewiad K., Kaewnopparat N., Faroongsarng D., Wungsintaweekul & Kaewnopparat S. (2016). *Optimisation of bambara groundnut water extract and skim milk composition as cryoprotectant for increasing cell viability of Lactobacillus spp. using response surface methodology*. *International Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13249>
- Kargi F. (2009). *Re-interpretation of the logistic equation batch microbial growth in relation to Monod kinetics*. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 398-401. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02537.x>.
- Korsak N., Taminiau B., Leclercq M., Nezer C., Crevecoeur S., Ferauche C., Detry E., Delcenserie V & Daube G. (2015). *Evaluation of the microbiota of kefir sample using metagenic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments*. *Journal of Dairy Science*, 98: 1-6. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9065>
- Leite A., Miguel M., Peixoto, R., Madiedo P., Paschoalin V., Mayo B. & Delgado S. (2015). *Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from brazilian kefir grains*. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9265>
- Leite A., Miguel M., Peixoto R., Rosado A., Silva J., Paschoalin V. (2012). *Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2 (44). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200001>
- Liu J., Wang S., Chen M., Chen H., Yuch P. & Lin C. (2006). *Hypocholesterolaemic effects of milk kefir and soymilk kefir in cholesterol fed hamsters*. *British Journal of Nutrition*, 95: 939-946. <https://doi.org/10.1079/BJN20061752>
- Liu J., Wang S., Lin Y. & Lin C. (2013). *Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor bearing mice*. *Journal of Nutrition and Cancer*, 44(2): 182-187. https://doi.org/10.1207/S15327914NC4402_10

- Liutkevicius A. & Sarkinas A. (2004). *Studies on the growth conditions and composition of kefir grain- as food and forage biomass*. Veterinarija ir zootechnika, 25(47). Recuperado de <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aId=106235>
- Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elguezabal N. & Garaizar J. (2006). *Kefir: A symbiotic yeasts-bacterias community with alleged healthy capabilities*. Revista Iberoamericana de micología, 23: 67-74. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854180>
- Magalhães K., Dias D., Pereira G., Oliveira J., Domingues L., Teixeira J., Silva J. & Schwan R. (2011). *Chemical composition and sensory analysis of cheese whey based beverages using kefir grains as starter culture*. International Journal of Food and Science Technology, 46: 871-878. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02570.x>
- Magalhães K., Pereira G., Campos C., Dragone G. & Schwan F (2011). *Brazilian Kefir: Structure, microbial communities and chemical composition*. Brazilian Journal of Microbiology, 42 (693-702). <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110002000034>
- Medrano M., Racedo S., Rolny I., Abraham G. & Pérez P. (2011). *Oral administration of kefir induces changes in the balance of immunecells in a murine model*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59 (10): 5299-5304. <https://doi.org/10.1021/jf1049968>
- National Food Safety Standard (2010). GB 5413.5: *Determination of lactosa and sucrose in foods for infants and Young children, milk and milk products*. Ministry of Helath of the Peoples Republico f China.
- Ojha K. & Tiwari B. (2016). *Novel Food Fermentation Technologies*. Food Engineering Series Springer International.
- Parvez S., Malik K., Kang S. & Kim H. (2005). *Probiotics and their fermented food products are beneficial for health*. Journal of Applied Microbiology, 100:1171-1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>.
- Pradhan A., Li M., Li Y., Kelso L., Costello T. & Johnson M. (2012). *A modified Weibull model for growth and survival of Listeria Innocua and Salmonella Typhimurium in chicken breasts during refrigerated and frozen storage*. Poultry Science 91: 1482-1488. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01851>
- Prado M., Blandón L., Vandenbergue L., Rodrigues C., Castro G., Soccol V. & Soccol C. (2015). *Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities and related products*. Frontiers in microbiology. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>
- Pulido H & Salazar R. (2008). *Análisis y Diseño de Experimentos*. Segunda Edición. McGraw Hill Interamericana, México.

- Schoevers & Britz (2003). *Influence of diferente culturing conditions on kefir grain increase*. Society of Dairy Technology. International Journal of Dairy Technology, 3 (56). <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00104.x>
- Setyowati H. & Setyani W. (2016) *Kefir: a new role as nutraceuticals*. Indonesian Journal of Medicine and Health, 7 (5). <https://doi.org/10.20885/JKKI.Vol7.Iss5.art5>
- Shiby V. & Mishra H. (2013). *Fermented milks and mil products as functional foods- a review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 5(53). <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.547398>.
- Simova E., Beshkova D. Angelov A., Hristozova T., Frengova G. & Spasov Z. (2002). *Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnonology, 28: 1-6. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000186>
- Tamime A. (2002). *Fermented milks: a historical food with modern applications- a review*. Dairy Science and Technology, 56: 52-55. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601657>
- Temmerman R., Huys G. & Swings J. (2004). *Identifcation of lactic acid bacteira: culture-dependent and culture-independent methods*. Trends in Food Science & Technology, 15: 348-359. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.007>
- Tramsêk, M. & Gorsêk A. (2008). *Analysis of Growth models for batch kefir grain biomass production in RCI reaction system*. Journal of Food Process Engineering 31(6): 754-767. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00187.x>
- Villalobos A. (2006). *Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada*. Agronomía Mesoamericana, 17(1): 55-61. Recuperado de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/5066>
- Witthuhn R., Schoeman T. & Britz T. (2004). *Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains*. International Journal of Dairy Technology, 57(1): 33-37. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00126.x>
- Wszolek M., Tamime T., Muir D. & Barclay (2001). *Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovina, caprine and ovine milk with different starter cultures*. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 34: 251-261. <https://doi.org/10.1006/fstl.2001.0773>
- Zajšek K. & Goršek A. (2010). *Modelling a batch kefir fermentation kinetics for etanol production by mixed natural microflora*. Journal of food and biproducts processing, 88. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.09.002>

Apéndices

APÉDICE A

DATOS EXPERIMENTALES

Cuadro A.1 Datos de volumen para determinación de proteína, lactosa y ácido láctico en leche

Determinación	Volumen de titulación (mL)		
	1	2	3
Proteína	10,85	10,70	10,80
Lactosa	12,00	11,80	11,30
Ácido láctico	1,70	1,60	1,65

Cuadro A.2 Datos de conteos previos a métodos de preservación.

Población	Granos Locales			Granos Comerciales		
	1	2	3	1	2	3
Levaduras (cfu/mL)	$7,50 \cdot 10^7$	$7,94 \cdot 10^7$	$9,60 \cdot 10^7$	$8,90 \cdot 10^7$	$7,41 \cdot 10^7$	$8,00 \cdot 10^7$
Bacterias (cfu/mL)	$1,89 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^8$	$1,90 \cdot 10^8$	$2,50 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^8$

Cuadro A.3 Datos de conteos posterior a métodos de preservación para granos locales

Población	Congelado			Secado		
	1	2	3	1	2	3
Levaduras (cfu/mL)	$7,41 \cdot 10^7$	$6,46 \cdot 10^7$	$8,50 \cdot 10^7$	$8,91 \cdot 10^7$	$6,85 \cdot 10^7$	$8,32 \cdot 10^7$
Bacterias (cfu/mL)	$1,07 \cdot 10^8$	$1,99 \cdot 10^8$	$1,66 \cdot 10^8$	$7,20 \cdot 10^7$	$6,95 \cdot 10^7$	$5,65 \cdot 10^7$

Cuadro A.4 Datos de biomasa antes y después y conteos después de fermentación a 35°C, 55 rpm y 27.5 g/L para granos comerciales.

Repetición	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Bacterias Final (cfu/mL)	Levaduras Final (cfu/mL)
1	5,5	5,90	$3,65 \cdot 10^6$	$8,60 \cdot 10^6$
2	5,5	5,89	$4,80 \cdot 10^6$	$7,70 \cdot 10^6$
3	5,5	5,90	$3,80 \cdot 10^6$	$9,80 \cdot 10^6$

Cuadro A.5 Datos de biomasa antes y después y conteos después de fermentación a 35°C, 55 rpm y 27.5 g/L para granos locales

Repetición	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Bacterias Final (cfu/mL)	Levaduras Final (cfu/mL)
1	5,5	5,91	$3,75 \cdot 10^6$	$9,00 \cdot 10^6$
2	5,5	5,89	$4,75 \cdot 10^6$	$9,40 \cdot 10^6$
3	5,5	5,89	$4,25 \cdot 10^6$	$8,65 \cdot 10^6$

Cuadro A.6. Conteos de bacterias y levaduras iniciales para el diseño experimental

Experimento	Bacterias iniciales (log(cfu/mL))			Levaduras iniciales (log(cfu/mL))		
8	3,51	3,56	3,53	3,51	3,50	3,54
18	3,50	3,59	3,51	3,50	3,52	3,53
15	3,48	3,52	3,60	3,49	3,54	3,53

Cuadro A.6 (continuación). Conteos de bacterias y levaduras iniciales para el diseño experimental

Experimento	Bacterias iniciales			Levaduras iniciales		
	(log(cfu/mL))			(log(cfu/mL))		
17	3,59	3,51	3,49	3,49	3,51	3,54
6	4,61	4,67	4,69	4,53	4,56	4,54
7	4,69	4,70	4,61	4,52	4,55	4,54
13	4,62	4,69	4,70	4,52	4,57	4,53
2	4,62	4,70	4,67	4,52	4,57	4,52
10	4,42	4,34	4,47	3,94	3,92	3,93
1	4,46	4,34	4,37	3,92	3,93	3,93
9	4,37	4,35	4,48	3,91	3,93	3,94
20	4,42	4,44	4,32	3,90	3,94	3,95
11	4,32	4,46	4,36	3,08	3,12	3,06
5	4,77	4,72	4,74	4,69	4,70	4,70
19	4,47	4,35	4,40	3,92	3,93	3,93
3	4,46	4,37	4,42	3,94	3,91	3,93
14	4,47	4,42	4,33	3,94	3,91	3,93
4	4,37	4,31	4,47	3,94	3,91	3,93
12	4,34	4,33	4,44	3,93	3,92	3,94
16	4,30	4,37	4,44	3,93	3,92	3,92

Cuadro A.7. Masa final y conteos finales para el diseño experimental

Experimento	Masa Final (g)	Bacterias finales			Levaduras finales		
		(log(cfu/mL))			(log(cfu/mL))		
8	3,91	7,33	7,37	7,34	7,32	7,44	7,28
18	2,94	6,68	6,66	6,72	6,98	6,99	7,00
15	4,09	7,18	7,15	7,21	7,32	7,41	7,34
17	3,09	6,74	6,76	6,74	6,59	6,59	6,61
6	9,24	7,07	7,09	7,04	6,96	6,97	6,96
7	8,49	6,57	6,61	6,62	6,18	6,16	6,26
13	9,50	6,93	6,94	6,92	7,00	6,99	7,00
2	8,56	6,67	6,63	6,62	6,56	6,54	6,60
10	7,95	7,39	7,41	7,43	7,32	7,38	7,30
1	5,72	6,10	6,13	6,22	5,64	5,60	5,61
9	5,68	6,96	6,97	7,00	6,79	6,78	6,78
20	6,18	8,11	8,24	8,13	7,78	7,80	7,81
11	1,32	7,30	7,27	7,30	7,28	7,28	7,30
5	10,36	6,51	6,52	6,54	6,51	6,56	6,49
19	5,91	6,60	6,54	6,58	6,96	6,98	6,90
3	5,89	6,69	6,66	6,67	6,96	6,96	7,00
14	5,89	6,62	6,65	6,61	7,00	6,95	6,88
4	5,90	6,53	6,56	6,60	6,91	7,00	6,87

Cuadro A.7 (continuación) Masa final y conteos finales para el diseño experimental

Experimento	Masa Final (g)	Bacterias finales (log(cfu/mL))			Levaduras finales (log(cfu/mL))		
12	5,89	6,67	6,67	6,70	6,90	6,88	6,89
16	5,90	6,51	6,62	6,59	6,97	7,00	6,99

Cuadro A.8 Volúmenes de titulación para determinaciones químicas de experimentos del diseño experimental.

Experimento	Proteína (ml)			Ácido Láctico (mL)			Lactosa (mL)		
8	7,50	7,20	7,70	5,60	5,40	5,80	19,80	20,1	19,2
18	7,55	7,10	7,40	7,20	6,80	7,60	22,50	22,00	22,90
15	8,20	8,10	8,30	5,60	6,10	6,00	19,50	19,30	19,70
17	7,70	7,60	7,20	7,00	7,40	6,90	19,10	19,00	19,50
6	8,20	8,10	8,60	6,90	6,90	7,2	20,00	21,00	19,00
7	8,80	9,00	9,05	7,60	7,70	7,50	25,50	23,00	25,00
13	8,95	8,90	9,0	6,20	5,90	6,20	22,00	21,00	21,80
2	8,30	8,60	8,60	7,40	7,20	7,30	21,00	19,00	21,50
10	7,80	7,65	7,65	7,10	6,80	7,10	19,30	19,60	19,60
1	8,00	8,20	7,95	7,75	7,60	7,75	22,60	22,20	22,10
9	8,15	8,20	8,40	6,50	6,60	6,40	19,80	20,60	21,10
20	7,60	7,10	7,80	6,40	6,30	7,1	26,10	25,80	26,10
11	7,70	7,80	8,20	5,90	6,00	6,10	21,20	20,50	21,30
5	8,35	8,60	8,70	6,45	6,75	6,60	25,85	26,10	26,05
19	7,90	7,75	7,75	6,80	6,80	7,10	20,50	22,00	20,50
3	7,90	7,60	7,90	6,75	6,90	6,90	20,50	20,00	21,00
14	7,80	7,70	8,20	6,80	6,95	7,1	20,30	21,90	22,30
4	7,60	7,40	7,80	6,80	6,65	6,65	19,80	21,50	18,7
12	7,80	7,75	8,15	7,20	6,80	7,00	19,95	20,50	22,55
16	7,90	7,95	7,70	6,70	6,95	7,05	21,60	21,30	21,60

Cuadro A.9 Datos de masa final (g) para la cinética de biomasa.

Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0	1,000	1,000	1,000
1	1,010	1,015	1,012
2	1,025	1,045	1,037
3	1,020	1,055	1,039
4	1,030	1,065	1,040
5	1,075	1,060	1,050
6	1,070	1,090	1,143
7	1,120	1,070	1,150
8	1,150	1,090	1,190
9	1,204	1,150	1,240
10	1,230	1,280	1,350
11	1,400	1,320	1,480

Cuadro A.9 (continuación) Datos de masa final (g) para la cinética de biomasa.

Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
13	1,450	1,483	1,530
14	1,657	1,677	1,596
15	1,699	1,634	1,664
16	1,766	1,746	1,648
17	1,639	1,625	1,875
18	1,816	1,766	1,788
19	1,828	1,850	1,877
20	1,856	1,877	1,880
21	1,897	1,818	1,878
22	1,989	1,909	1,767
23	1,984	1,960	1,893
24	1,908	1,963	1,995
26	1,958	1,970	1,924
28	1,960	1,922	1,914
30	1,940	1,920	1,950
32	1,902	1,925	1,930

Cuadro A.10 Datos de volumen de titulación de acidez titulable para cinética de ácido láctico.

Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	1,900	1,900	1,950
2	1,900	2,000	2,000
3	2,100	2,100	2,200
4	2,200	2,150	2,200
5	2,250	2,250	2,200
6	2,300	2,300	2,250
7	2,500	2,450	2,500
8	2,600	2,650	2,600
9	2,850	2,800	2,800
10	2,950	2,950	3,000
11	3,300	3,200	3,250
13	3,700	3,650	3,700
14	4,300	4,400	4,350
15	5,100	5,150	5,200
16	6,100	6,200	6,200
17	6,900	7,000	6,950
18	7,900	7,950	8,000
19	8,500	8,600	8,600
20	9,400	9,350	9,300
21	9,600	9,700	9,650
22	9,900	9,950	9,950
23	10,400	10,450	10,450
24	10,900	10,850	10,900
26	11,550	11,550	11,500

Cuadro A.10 (continuación) Datos de volumen de titulación de acidez titulable para cinética de ácido láctico.

Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
28	11,900	11,950	12,000
30	12,300	12,400	12,450
32	12,500	12,600	12,550

Cuadro A.11 Datos para cálculo de densidad de kéfir.

Muestra	Masa (g)	Volumen (mL)
1	29,332	10
2	29,333	
3	29,331	

Cuadro A.12 Datos para cálculo de viscosidad de kéfir

Muestra	Tiempo (s)	Constante (cSt/s)
1	18,29	0,008
2	18,02	
3	18,39	

Cuadro A.13. Datos de pH kéfir.

Muestra	pH	Temperatura (°C)
1	4,32	24,9
2	4,33	25,0
3	4,33	25,1

Cuadro A.14 Datos para cálculo de densidad de leche.

Muestra	Masa (g)	Volumen (mL)
1	29,308	10
2	29,307	
3	29,311	

Cuadro A.15 Datos para cálculo de viscosidad de leche

Muestra	Tiempo (s)	Constante (cSt/s)
1	2,78	0,008
2	2,83	
3	2,80	

Cuadro A.16. Datos de pH leche

Muestra	pH	Temperatura (°C)
1	6,64	25,0
2	6,65	25,1
3	6,64	25,0

APÉDICE B

RESULTADOS INTERMEDIOS

Cuadro B.1 Determinación de proteína, lactosa y ácido láctico en leche y promedios

Determinación	Valor			Promedio
	1	2	3	
Proteína (%m/m)	3,27	3,32	3,29	3,29
Lactosa (%m/m)	5,10	5,19	5,42	5,23
Ácido láctico (%m/v)	0,15	0,14	0,15	0,15

Cuadro B.2 Datos de conteos previos a métodos de preservación.

Población	Granos Locales			Granos Comerciales		
	1	2	3	1	2	3
Levaduras (log(cfu/mL))	7,88	7,90	7,98	7,95	7,87	7,90
Bacterias (log(cfu/mL))	8,28	8,30	8,04	8,28	8,40	8,00

Cuadro B.3 Datos de conteos posterior a métodos de preservación para granos locales

Población	Congelado			Secado		
	1	2	3	1	2	3
Levaduras (log(cfu/mL))	7,87	7,81	7,93	7,84	7,92	7,95
Bacterias (log(cfu/mL))	8,03	8,22	8,30	7,86	7,84	7,75

Cuadro B.4 Datos de crecimiento de biomasa y conteos después de fermentación a 35°C, 55 rpm y 27.5 g/L para granos comerciales.

Repetición	Crecimiento biomasa (%)	Bacterias Final (log(cfu/mL))	Levaduras Final (log(cfu/mL))
1	7,33	6,56	6,93
2	7,07	6,68	6,89
3	7,20	6,58	6,99

Cuadro B.5 Datos de crecimiento de biomasa y conteos después de fermentación a 35°C, 55 rpm y 27.5 g/L para granos locales

Repetición	Crecimiento biomasa (%)	Bacterias Final (log(cfu/mL))	Levaduras Final (log(cfu/mL))
1	7,40	6,57	6,95
2	7,00	6,68	6,97
3	7,13	6,63	6,94

Cuadro B.6. Conteos iniciales para el diseño experimental, promedio y desviación

Experimento	Bacterias iniciales (log(cfu/mL))	Levaduras iniciales (log(cfu/mL))
8	3,53 ± 0,029	3,51 ± 0,019
18	3,53 ± 0,052	3,50 ± 0,017
15	3,53 ± 0,061	3,49 ± 0,022
17	3,53 ± 0,053	3,49 ± 0,023
6	4,66 ± 0,040	4,53 ± 0,019
7	4,67 ± 0,048	4,52 ± 0,016
13	4,67 ± 0,040	4,52 ± 0,022
2	4,66 ± 0,040	4,52 ± 0,028
10	4,41 ± 0,065	3,94 ± 0,006
1	4,39 ± 0,063	3,92 ± 0,007
9	4,40 ± 0,067	3,91 ± 0,017
20	4,40 ± 0,065	3,90 ± 0,025
11	4,38 ± 0,072	3,08 ± 0,031
5	4,74 ± 0,029	4,69 ± 0,004
19	4,41 ± 0,059	3,92 ± 0,009
3	4,42 ± 0,046	3,94 ± 0,014
14	4,41 ± 0,070	3,94 ± 0,016
4	4,38 ± 0,080	3,94 ± 0,015
12	4,37 ± 0,059	3,93 ± 0,010
16	4,37 ± 0,060	3,93 ± 0,004

Cuadro B.7. Masa final y conteos finales para el diseño experimental.

Experimento	Bacterias finales (log(cfu/mL))	Levaduras finales (log(cfu/mL))
8	7,35 ± 0,020	7,35 ± 0,083
18	6,68 ± 0,032	6,99 ± 0,008
15	7,18 ± 0,028	7,36 ± 0,049
17	6,75 ± 0,008	6,60 ± 0,014
6	7,07 ± 0,024	6,96 ± 0,008
7	6,60 ± 0,025	6,20 ± 0,051
13	6,93 ± 0,011	7,00 ± 0,002
2	6,64 ± 0,026	6,57 ± 0,031
10	7,41 ± 0,021	7,33 ± 0,041
1	6,15 ± 0,062	5,62 ± 0,021
9	6,98 ± 0,018	6,78 ± 0,004
20	8,16 ± 0,066	7,80 ± 0,014
11	7,29 ± 0,017	7,29 ± 0,012
5	6,52 ± 0,017	6,52 ± 0,038
19	6,57 ± 0,030	6,95 ± 0,040
3	6,67 ± 0,018	6,97 ± 0,021

Cuadro B.7 (continuación) Masa final y conteos finales para el diseño experimental

Experimento	Bacterias finales (log(cfu/mL))	Levaduras finales (log(cfu/mL))
14	6,63 ± 0,020	6,94 ± 0,059
4	6,56 ± 0,031	6,92 ± 0,066
12	6,68 ± 0,017	6,89 ± 0,009
16	6,57 ± 0,061	6,99 ± 0,015

Cuadro B.8 Porcentajes de proteína, lactosa y ácido láctico para experimentos del diseño experimental.

Experimento	Proteína (%m/m)	Ácido Láctico (%v/m)	Lactosa (%m/m)
8	4,47 ± 0.26	1,00 ± 0.20	3,11 ± 0.46
18	4,52 ± 0.23	1,17 ± 0.40	2,72 ± 0.45
15	4,22 ± 0.10	0,96 ± 0.53	3,14 ± 0.20
17	4,47 ± 0.26	1,15 ± 0.26	3,19 ± 0.26
6	4,18 ± 0.13	1,19 ± 0.51	3,06 ± 1.00
7	3,95 ± 0.13	1,23 ± 0.10	2,50 ± 1.32
13	3,95 ± 0.41	0,99 ± 0.17	2,83 ± 0.53
2	4,11 ± 0.17	1,18 ± 0.10	2,99 ± 1.32
10	4,39 ± 0.09	1,17 ± 0.17	3,14 ± 0.17
1	4,27 ± 0.13	1,28 ± 0.11	2,74 ± 0.26
9	4,20 ± 0.13	1,09 ± 0.10	2,99 ± 0.66
20	4,47 ± 0.36	1,10 ± 0.44	2,36 ± 0.21
11	4,32 ± 0.26	1,07 ± 0.10	2,91 ± 0.44
5	4,09 ± 0.18	1,17 ± 0.40	2,35 ± 0.13
19	4,36 ± 0.46	1,23 ± 0.17	2,91 ± 0.87
3	4,36 ± 0.17	1,22 ± 0.09	2,99 ± 0.50
14	4,32 ± 0.62	1,25 ± 0.20	2,85 ± 1.06
4	4,43 ± 0.20	1,19 ± 0.09	3,06 ± 1.41
12	4,32 ± 0.22	1,25 ± 0.20	2,91 ± 1.37
16	4,34 ± 0.13	1,26 ± 0.41	2,85 ± 0.17

Cuadro B.9 Crecimientos de biomasa y conteos.

Experimento	Crecimiento biomasa (%)	Bacterias finales (log(cfu/mL))	Levaduras finales (log(cfu/mL))
8	39,54	3,83	3,83
18	5,14	3,18	3,47
15	46,13	3,66	3,84
17	10,29	3,23	3,08
6	12,73	2,39	2,42
7	3,51	1,92	1,65
13	15,80	2,25	2,45
2	4,39	1,96	2,02
10	44,51	3,03	3,41
1	3,93	1,77	1,69

Cuadro B.9 (continuación) Crecimientos de biomasa y conteos.

Experimento	Crecimiento biomasa (%)	Bacterias finales (log(cfu/mL))	Levaduras finales (log(cfu/mL))
9	3,27	2,60	2,85
20	12,44	3,78	3,86
11	32,40	3,95	4,20
5	3,60	1,80	1,82
19	7,40	2,19	3,02
3	7,00	2,30	3,04
14	7,13	2,25	3,01
4	7,33	2,18	3,00
12	7,07	2,30	2,95
16	7,20	2,20	3,06

Cuadro B.10 Datos de concentración final (g/L) para la cinética de biomasa.

Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0	5,000	5,000	5,000
1	5,050	5,075	5,060
2	5,125	5,225	5,185
3	5,100	5,275	5,195
4	5,150	5,325	5,200
0	5,000	5,000	5,000
1	5,050	5,075	5,060
2	5,125	5,225	5,185
3	5,100	5,275	5,195
4	5,150	5,325	5,200
5	5,375	5,300	5,250
6	5,350	5,450	5,715
7	5,600	5,350	5,750
8	5,750	5,450	5,950
9	6,020	5,750	6,200
10	6,150	6,400	6,750
11	7,000	6,600	7,400
13	7,250	7,415	7,650
14	8,285	8,385	7,980
15	8,495	8,170	8,320
16	8,830	8,730	8,240
17	8,195	8,125	9,375
18	9,080	8,830	8,940
19	9,140	9,250	9,385
20	9,280	9,385	9,400
21	9,485	9,090	9,390
22	9,945	9,545	8,835
23	9,920	9,800	9,465
24	9,540	9,815	9,975

Cuadro B.10 Datos de concentración final (g/L) para la cinética de biomasa.

Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
26	9,790	9,850	9,620
28	9,800	9,610	9,570
30	9,700	9,600	9,750
32	9,510	9,625	9,650

Cuadro B.11 Datos de volumen de titulación de acidez titulable para cinética de ácido láctico, menos volumen de titulación utilizado en leche.

Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	0,250	0,250	0,300
2	0,250	0,350	0,350
3	0,450	0,450	0,550
4	0,550	0,500	0,550
5	0,600	0,600	0,550
6	0,650	0,650	0,600
7	0,850	0,800	0,850
8	0,950	1,000	0,950
9	1,200	1,150	1,150
10	1,300	1,300	1,350
11	1,650	1,550	1,600
13	2,050	2,000	2,050
14	2,650	2,750	2,700
15	3,450	3,500	3,550
16	4,450	4,550	4,550
17	5,250	5,350	5,300
18	6,250	6,300	6,350
19	6,850	6,950	6,950
20	7,750	7,700	7,650
21	7,950	8,050	8,000
22	8,250	8,300	8,300
23	8,750	8,800	8,800
24	9,250	9,200	9,250
26	9,900	9,900	9,850
28	10,250	10,300	10,350
30	10,650	10,750	10,800
32	10,850	10,950	10,900

Cuadro B.12 Densidad de kéfir a 25°C

Muestra	Densidad (g/mL)	Promedio con desviación
1	1,0568	1,0568 ± 0,0001
2	1,0569	
3	1,0567	

Cuadro B.13 Viscosidad del kéfir a 25°C

Muestra	Viscosidad (cP)	Promedio con desviación
1	14,632	14,5867 ± 0,1531
2	14,416	
3	14,712	

Cuadro B.14 pH del kéfir a 25°C

Muestra	pH	Desviación estándar
Promedio	4,326	0,005

Cuadro B.15 Densidad de leche a 25°C

Muestra	Densidad (g/ml)	Promedio con desviación
1	1,0544	1,0544 ± 0,0002
2	1,0543	
3	1,0547	

Cuadro B.16 Viscosidad de la leche a 25°C

Muestra	Viscosidad (cP)	Promedio con desviación
1	2,222	2,240 ± 0,0201
2	2,264	
3	2,240	

Cuadro B.17 pH de la leche a 25°C

Muestra	pH	Desviación estándar
Promedio	6,643	0,005

APENDICE C

MUESTRA DE CÁLCULO

C.1 Determinación de proteína

$$\% \textit{prot} = \frac{V_{tit} * 0,14 * f}{V_m} \quad (\text{C.1})$$

Del Cuadro A.1: el volumen de titulación de la muestra en la columna 2 fila 2 es de 10,85 mL, un volumen de ácido sulfúrico para la captación de amoníaco de 20 mL, el factor de conversión es para lácteos es de 6,38 y el volumen de la muestra de 2,5 mL. Se obtiene el valor de la Cuadro B.1 columna 2 fila 1 de 3,27 % de proteína en la muestra.

C.2 Determinación de lactosa

$$\% \textit{lac} = \frac{V_d * 0,068 * 100}{V_m * V_{tit}} \quad (\text{C.2})$$

Del Cuadro A.1: el volumen de titulación de la muestra en la columna 3 fila 3 es de 11,30 mL, un volumen de dilución de 90 mL y un volumen de muestra de 10 mL. Se obtiene el resultado del Cuadro B.1 columna 3 fila 2 de 5,42 % de lactosa en la muestra.

C.3 Determinación de ácido láctico

$$\% \textit{ac} = \frac{V_{tit} * f * 0,9}{V_m} \quad (\text{C.3})$$

Del Cuadro A.1: el volumen de titulación de la muestra en la columna 2 fila 4 es de 1,60 mL, un factor de corrección de la solución de hidróxido de sodio de 0,98 y un volumen de muestra de 10 mL. Se obtiene el resultado del Cuadro B.1 columna 2 fila 2 de 0,14 % de ácido láctico en la muestra.

C.4 Determinación de crecimiento de biomasa

$$\% \textit{bm} = \frac{(bm_f - bm_i)}{bm_i} * 100 \quad (\text{C.4})$$

Del Cuadro A.4: la masa final de grano de kéfir de la columna 3 fila 2 es de 5,90 g y la masa inicial de los granos de kéfir es de 5,50 g. Se obtiene el resultado del Cuadro B.4 columna 2 fila 2 7,33 % de crecimiento de granos de kéfir.

C.5 Determinación de concentración de granos de kéfir.

$$C_m = \frac{M_g}{V_T} \quad (C.5)$$

Del Cuadro A.9 la masa de la muestra de la columna 3 fila 5 es de 1,055 g y el volumen de fermentación es de 200 mL (0,2 L) Se obtiene el resultado de concentración de granos de kéfir del Cuadro B.10 columna 3 fila 5 de 5,275 g/L.

C.6 Determinación de volumen de diferencia de ácido láctico

$$\Delta V_{ac} = V_{ac,kef} - V_{ac,l} \quad (C.6)$$

Del Cuadro A.10 el volumen de titulación utilizado en la muestra de kéfir se muestra en la columna 4 fila 8 es de 2,50 mL y el volumen promedio de titulación utilizado en leche es de 1,65 mL y se obtiene promediando los valores del Cuadro A.1 de la fila 4 columnas 2, 3 y 4. Se obtiene el resultado de diferencia de volúmenes de titulación correspondiente a la producción de ácido láctico del Cuadro B.11 columna 4 fila 8 de 0,850 mL.

C.7 Determinación de densidad

$$d = \frac{M_{exp}}{V_{pic}} \quad (C.7)$$

Del Cuadro A.11 la masa del picnómetro con la muestra de la columna 2 fila 3 es de 29,307 g y la masa del picnómetro es de 18,764 g. Se obtiene el resultado del Cuadro B.12 columna 2 fila 2 de 1,1274 g/ mL de densidad.

C.8 Determinación de viscosidad

$$v = \gamma * q \quad (C.8)$$

Del Cuadro A.12 el tiempo de recorrido de la muestra de la columna 2 fila 2 es de 18,29 s y la constante del viscosímetro es de 0,008 cSt/s. Se obtiene el resultado del Cuadro B.12 columna 2 fila 2 de 0,1463 cST (un centistoke es igual a 100 centipoise).

Apéndice D
MÉTODOS DE ANÁLISIS

D1. Determinación de proteína.

La determinación de proteína se hace por el método Kjeldahl clásico (ISO, 2014).

- 1.- Transferir 2,50 mL de muestras utilizando una pipeta al balón Kjeldahl.
- 2.- Adicionar 12,5 mL de ácido sulfúrico y 3 g de mezcla catalítica.
- 3.- Colocar en el digestor, dentro de la capilla, y empezar a digerir la muestra. Esperar a que la solución se ponga de color azul-verdoso (verde esmeralda) y ya no contenga material “no digerido”, que no tenga puntos negros.
- 4.- Digerir por una hora más.
- 5.- Apagar el digestor y dejar enfriar
- 6.- Transferir cuantitativamente el material del balón a un frasco de destilación del sistema de destilación automático. Realizar lavados con 20-40 mL de agua destilada al frasco de Kjeldahl.
- 7.- Antes de seguir con el paso 9, asegurarse de sumergir la extremidad cónica del condensador del equipo en un erlenmeyer de 500 mL que contenga 120 mL de agua destilada, 5 gotas de rojo de metilo y 20 mL de ácido sulfúrico a 0,05M.
- 8.- Antes de conectar al equipo de destilación el matraz con la muestra adicione 5 gotas de fenolftaleína.
- 9.- Conectar el matraz al equipo de destilación y adicionar lentamente (con ayuda de la bomba de dosificación) una disolución de hidróxido de sodio a 4M hasta que haya un exceso de base.
- 10.- Destilar por alrededor de 20 min o hasta que se hayan recolectado 250-300 mL de destilado.
- 11.- El destilado debe permanecer con un color rojo (esto quiere decir que sigue con pH ácido). Titular el exceso de ácido con una disolución de hidróxido de sodio a 0,1 M
- 12.- Si después de llevar a cabo la destilación el destilado cambia a color amarillo eso quiere decir que la muestra es básica y se liberó más amoníaco de lo esperado. Esto quiere decir que la muestra tiene más nitrógeno de lo estipulado (y por ende más proteína). Se debe repetir el ensayo utilizando más mililitros de ácido sulfúrico en el paso 7.

Calculo:

$$\% \text{ prot} = \frac{V_{tit} * 0,14 * f}{V_m} \quad (\text{D.1})$$

Donde:

V_{tit} : es la diferencia entre el número de ml de ácido sulfúrico a 0,05 M y el número de mililitros de hidróxido de sodio a 0,1M utilizados en la titulación, ml.

V_m : es el volumen de la muestra, mL.

f : es el factor de conversión (6,38 para el caso de productos lácteos).

D.2 Determinación de lactosa en azúcares red.

La determinación de azúcares reductores se hace por el método de Lane y Eynon, descrito en la norma GB 5413.5 del *National Food Safety Standard* (2010), también se utilizó de guía el Manual de Normas Analíticas del Instituto Adolfo Lutz (2008)

Reactivos

Solución Fehling A

1. Pesar 34,639 g de sulfato de cobre pentahidratado y transfiera a un balón volumétrico de 1000 mL.
2. Completar el volumen con agua

Solución de Fehling B

1. Pesar 173 g de tartrato de sodio y potasio
2. Colocar dentro de un balón de 1000 mL y disolver con 250 ml de agua destilada.
3. Adicionar 250 mL de solución de NaOH 2M recién preparada.
4. Completar el volumen hasta 1000 mL.

Calibración con glucosa

1. Secar el azúcar por dos horas
2. Pesar 1 g y disolver en 1000 mL de agua

3. Transferir 50 mL de la solución a una bureta
4. Transferir 20 mL de la solución de Fehling (10 mL de A y 10 mL de B) a un erlenmeyer de 250 ml. Añadir 40 mL de agua destilada.
5. Con ayuda de la bureta colocar 15 mL de la solución de glucosa dentro del erlenmeyer.
6. Colocar el erlenmeyer en una plantilla de calentamiento y dejar que la solución hierva por dos minutos.
7. Valorar hasta que el color azul desaparezca, apuntar el volumen de solución de glucosa utilizado.
8. Cálculo del factor de corrección: El factor de corrección debe ser de 0,05 o menor de esta manera se sabe que las soluciones están calibradas.
9. El procedimiento se debe repetir al menos 3 veces.

$$f_1 = \frac{1 * V_1}{1000} \quad (\text{D.2})$$

Donde:

V_1 : volumen de solución de glucosa utilizado en valoración, mL.

f_1 : factor de corrección para la solución de Fehling

Determinación:

1. Transferir con ayuda de una pipeta volumétrica 10 mL de la muestra a un balón volumétrico de 100 mL, añada 50 mL de agua, 2 mL de solución de sulfato de zinc al 30% y 2 mL de solución de ferrocianuro de potasio al 15%. Mezclar bien después de cada adición.
2. Dejar sedimentar por 5 min, completar el volumen con agua y agitar.
3. Filtrar con un papel filtro y recibir el filtrado en un frasco erlenmeyer de 300 mL.
4. En un erlenmeyer de 250 mL transferir 10 mL de cada una de las soluciones de Fehling y adicionar 40 mL de agua. Calentar hasta ebullición en la plantilla.
5. Transferir el filtrado a una bureta de 25 mL y adicionar a una velocidad de una gota por segundo sobre el erlenmeyer con la disolución en ebullición.
6. Agitar utilizando un polocio hasta que la solución se torne de azul a incoloro con un precipitado rojo en el fondo del recipiente.

Ecuaciones:

$$\% \text{ lactosa} = \frac{V_d * 0,068 * 100}{V_m * V_{tit}} \quad (\text{C.1})$$

Donde:

V_d : volumen de dilución de la muestra, mL.

0,068: número de gramos de lactosa que corresponden a 20 mL de solución de Fehling. (Cuadro D.1)

Cuadro D.1 Factores para lactosa y azúcar invertido (10 mL disolución de Fehling)

Volumen de Valoración (mL)	Lactosa (mg)	Azúcar invertido (mg)	Volumen de Valoración (mL)	Lactosa (mg)	Azúcar invertido (mg)
15	68,3	50,5	33	67,8	51,7
16	68,2	50,6	34	67,9	51,7
17	68,2	50,7	35	67,9	51,8
18	68,1	50,8	36	67,9	51,8
19	68,1	50,8	37	67,9	51,9
20	68,0	50,9	38	67,9	51,9
21	68,0	51,0	39	67,9	52,0
22	68,0	51,0	40	67,9	52,0
23	67,9	51,1	41	68,0	52,1
24	67,9	51,2	42	68,0	52,1
25	67,9	51,2	43	68,0	52,2
26	67,9	51,3	44	68,0	52,2
27	67,8	51,4	45	68,1	52,3
28	67,8	51,4	46	68,1	52,3
29	67,8	51,5	47	68,2	52,4
30	67,8	51,5	48	68,2	52,4
31	67,8	51,6	49	68,2	52,5
32	67,8	51,6	50	68,3	52,5

D.3 Determinación de ácido láctico

El procedimiento de la determinación de acidez en ácido láctico por medio del método de valoración se hizo siguiendo la norma NMX-F-420 de la Dirección Deneral de Normas en México (1982), también se utilizó de guía el Manual de Normas Analíticas del Instituto Adolfo Lutz (2008).

Procedimiento:

1. Transferir con ayuda de una pipeta 10 mL de la muestra a un beaker de 100 mL (pipetear previamente una porción de la muestra y desecharla)
2. Adicionar 10 mL de agua destilada, para diluir la muestra y notar con más facilidad el cambio de color.
3. Adicionar 5 gotas de solución de fenolftaleína.
4. Titular con una solución de hidróxido de sodio a 0,1M, utilizar una bureta de 25 mL.
5. Titular hasta que se torne rosa pálido.

Ecuaciones:

$$\% ac = \frac{V_{tit} * f_c * 0,9}{V_m} \quad (C.4)$$

Donde:

f_c : factor de corrección de la solución de hidróxido de sodio, adim.

Anexo



NOMBRE DEL PROYECTO: Kefir, yogur funcional

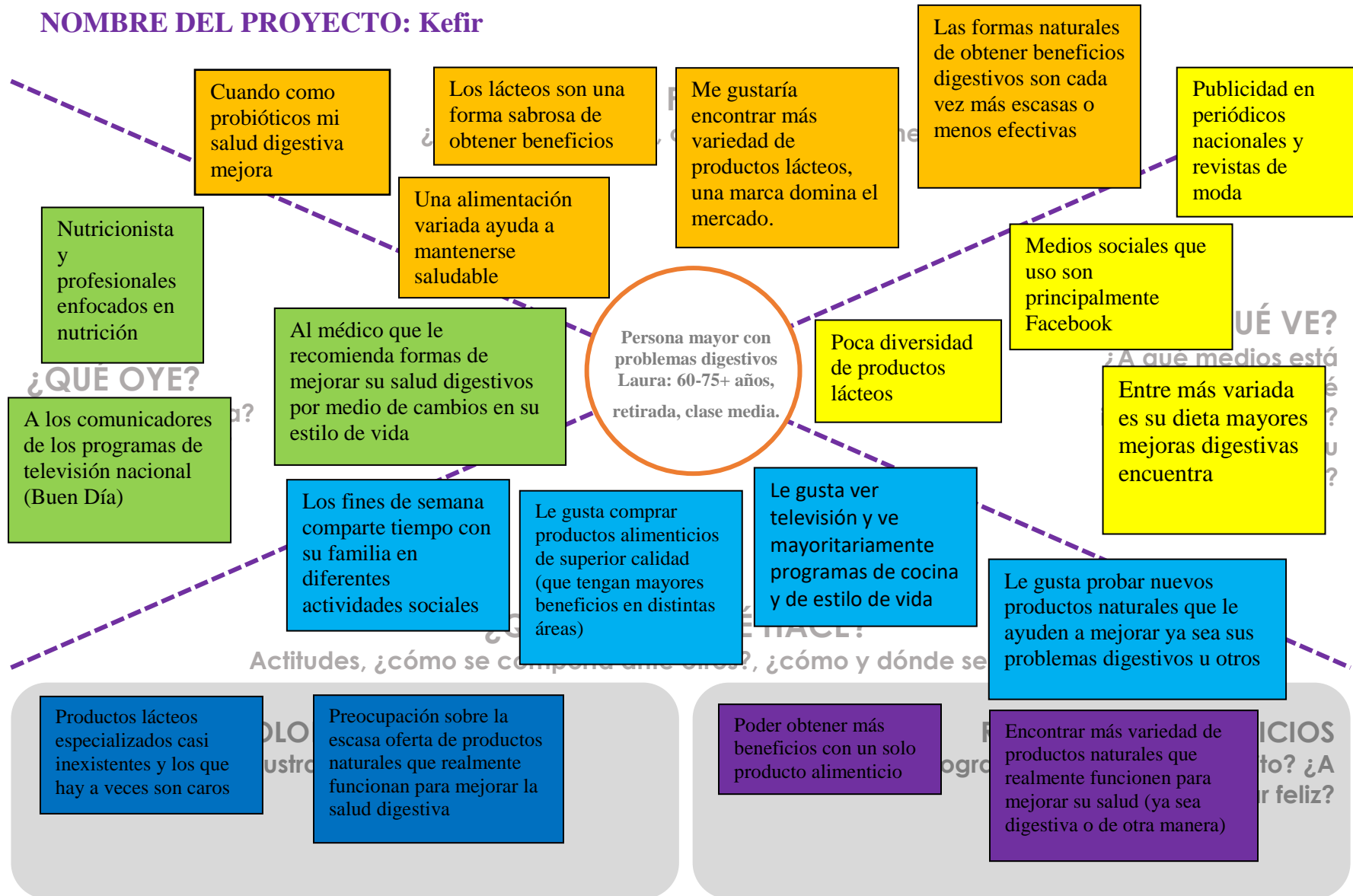
Sector	Adultos Mayores	Intolerantes a la lactosa	Deportistas	Personas con problemas de colitis	Jóvenes que buscan cosas diferentes
Usuario Final	Hombres y mujeres de más de 60 años	Personas con intolerancia a la lactosa	Personas que realizan mucho deporte	Personas que padezcan este u otro problema digestivo	Personas que busquen experimentar con productos nuevos diferentes
Aplicación	Ayuda a la digestión, estimula sistema inmunológico y contiene altos % calcio	Contiene porcentajes reducidos de lactosa además de una gran cantidad de probióticos	Contiene diversas proteínas y aminoácidos, entre ellos triptófano (aminoácido responsable por la producción de serotonina).	Reducir síntomas de la colitis y ayudar con la digestión	Dar variedad a la dieta, probar cosas nuevas y experimentar
Ventajas	Tiene el poder adquisitivo para este producto y presentan dificultades en conseguir productos que funcionen realmente bien en solucionar estos problemas.	Hay gran incidencia de intolerancia a la lactosa en CR y el mundo. Es difícil encontrar variedad de productos en esta área.	Es un producto que tiene buen sabor y en comparación a otros de la misma rama (productos lácteos) tienen propiedades extra. Es un mercado a pagar por los beneficios que obtienen de sus alimentos	Es un producto que es parte de la dieta diaria que tiene la funcionalidad de servir como “medicina preventiva” a la vez.	A parte de su gran sabor puede venir en diversas presentaciones (helado, yogur, batido), producto poco conocido en el país.
Clientes referentes	Cecilia Gaviria Carlos Escudero Felipe Vargas	Doris Belisario Stephen Taylor Oscar Brenes	Andrés Lizano Olman Vargas Stephen Taylor Gabriela Garcia	Marisol Molestina	Jorge Benavides Daniela de Sainz
Características del Mercado	Hay disposición a pagar (más) por productos naturales que los ayuden a mejorar su salud digestiva. El contenido de azúcar y grasa no presenta un problema.	Se percibe una disconformidad con la limitada variedad de productos lácteos que no contengan lactosa	Están acostumbrados a pagar un precio alto por productos que aportan características como alto contenido de proteína y probióticos. No les importa que los productos tengan	Están dispuestos a probar alternativas naturales que alivien los síntomas.	Personas abiertas a probar productos nuevos.



			todo el contenido de grasa o carbohidratos.		
Socios	Nutricionistas Supermercados	Supermercados Nutricionistas Tiendas de batidos	Nutricionistas Entrenadores Bloggers de deporte Supermercados Tiendas de batidos	Nutricionistas Macrobióticas	Supermercados Restaurantes Bloggers de comida Tiendas de batidos
Competidores	Yogur griego y bebidas probióticas	Dos pinos (línea de productos deslactosados)	Yogur griego y bebidas probióticas	Productos lácteos fermentados	
Alternativas		Suplementos enzimáticos		Agilizadores de la digestión (laxantes naturales)	Kombucha o kéfir de agua

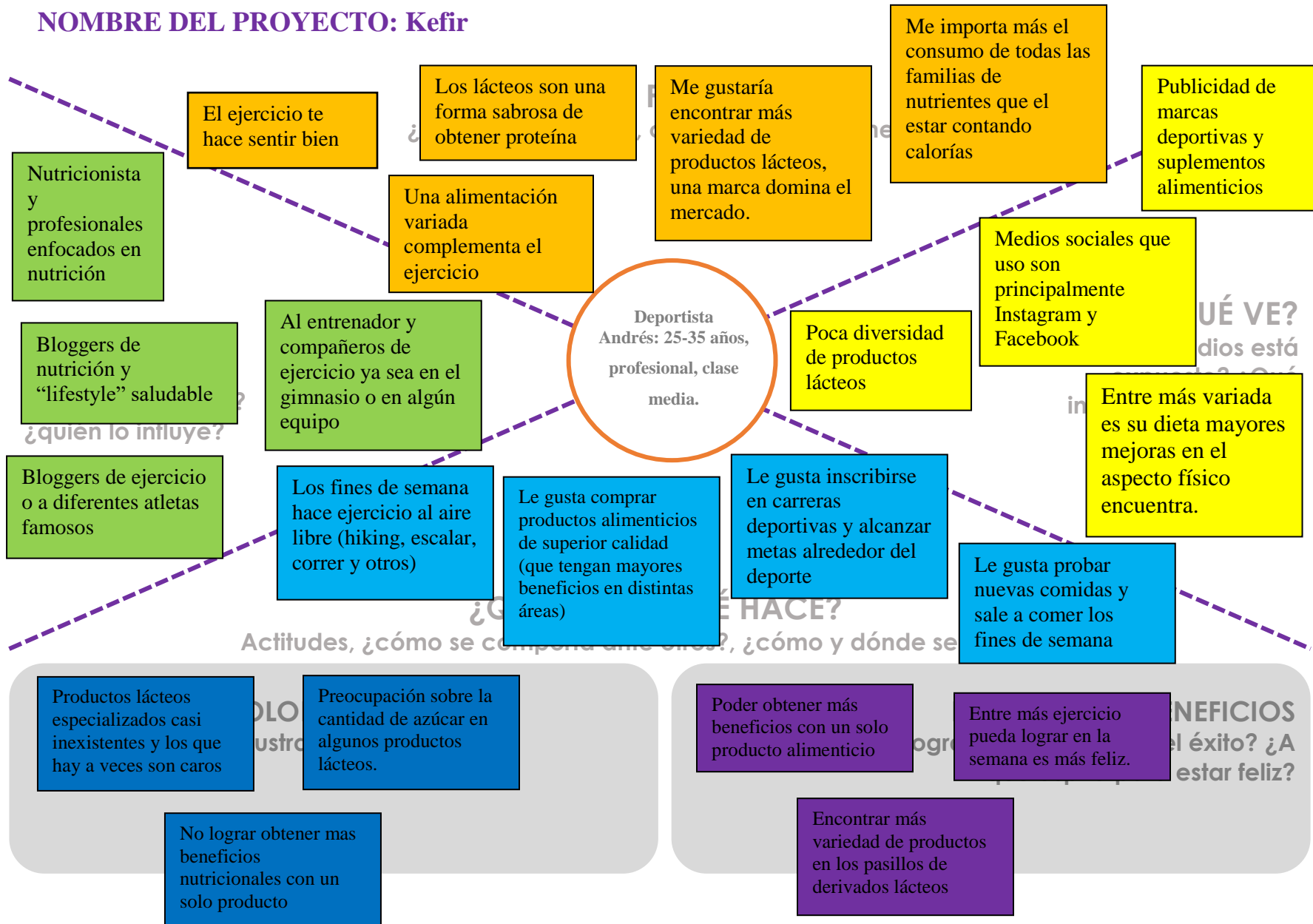


NOMBRE DEL PROYECTO: Kefir



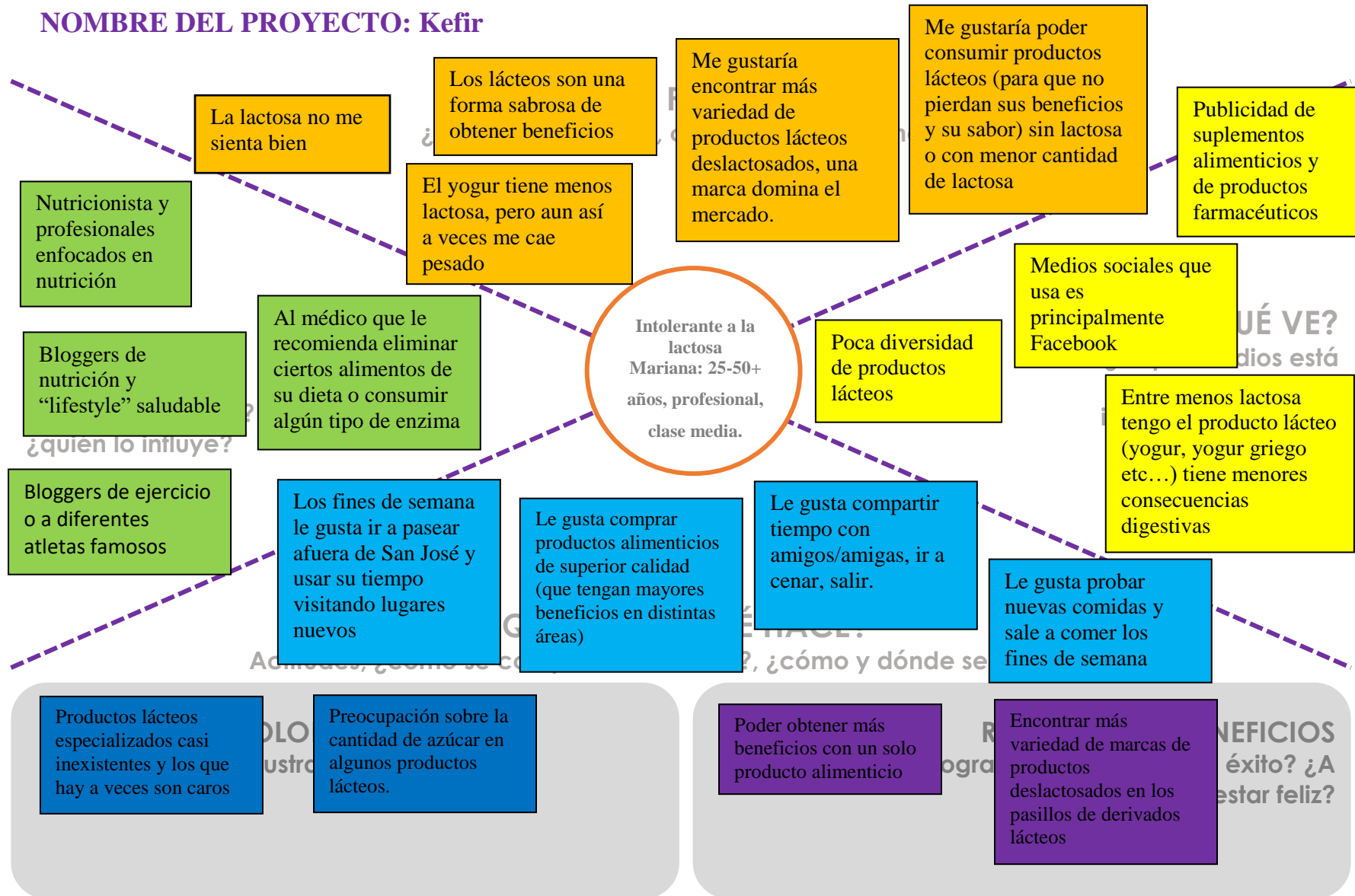


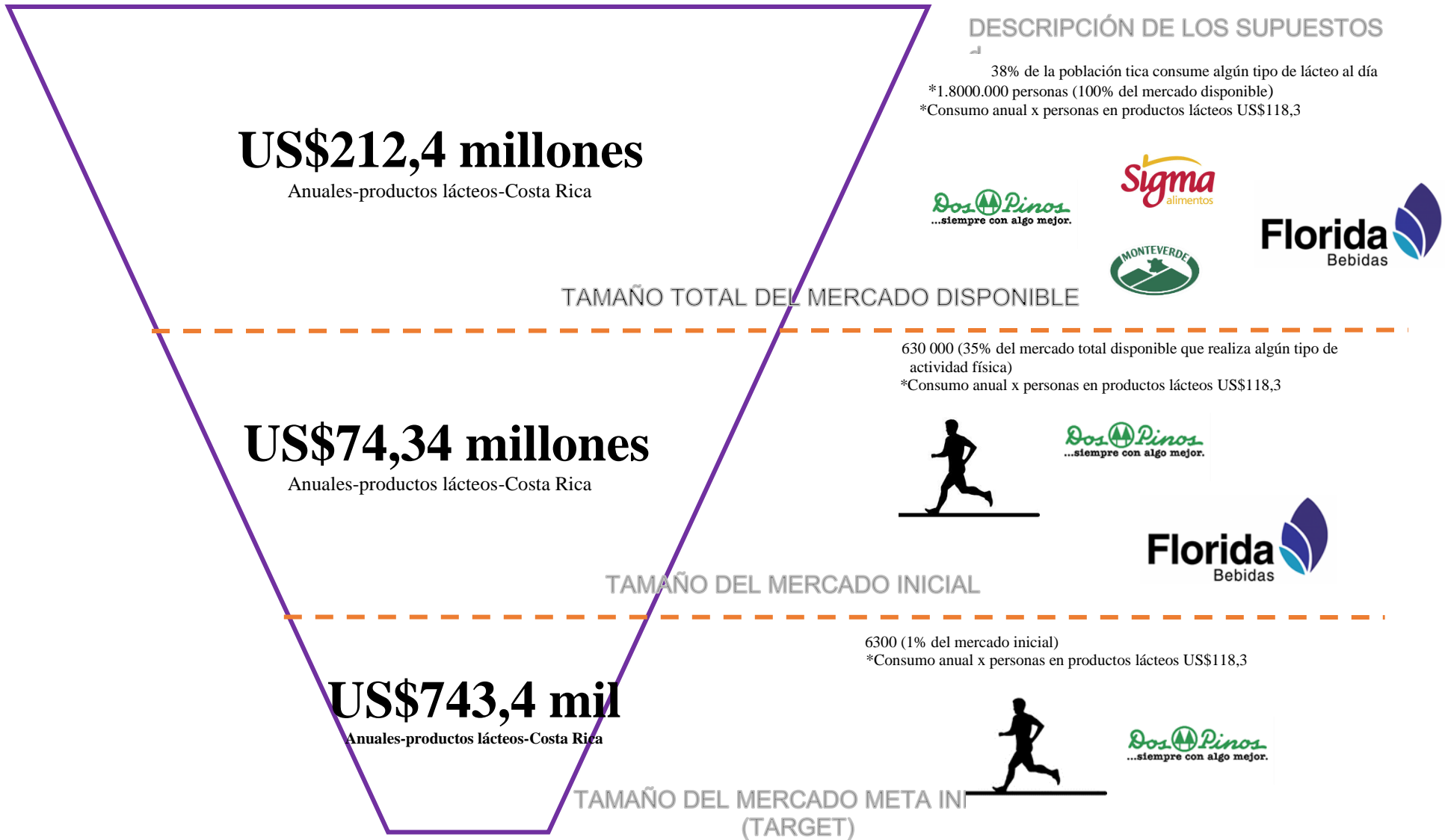
NOMBRE DEL PROYECTO: Kefir





NOMBRE DEL PROYECTO: Kefir





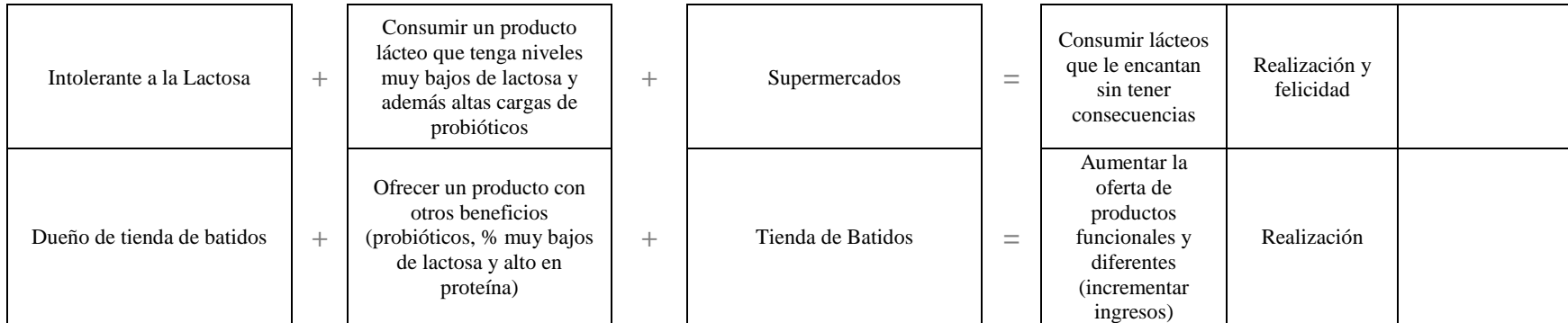


**PROYECTO DE
EMPRENDIMIENTO:**

Kefir

CANVAS DE TRABAJOS POR HACER (JOBS TO BE DONE)

PERSONA ¿QUIÉN?	+	ACCION ¿QUÉ REQUIERE QUE SE HAGA?	+	CONTEXTO ¿DÓNDE O CUÁNDO?	=	RESULTADOS ESPERADOS		
						Resultado Funcional	Resultado Emocional	Resultado Social
Adulto Mayor (65+ años)	+	Soluciona síntomas (de) y previene problemas digestivos (colitis, gastritis y otros)	+	Supermercados	=	Mejora salud digestiva	Tranquilidad	
Adulto Mayor (65+ años)	+	Regulador de la actividad digestiva	+	Macrobióticas, Ferias de salud	=	Mejora regularidad digestiva	Tranquilidad	
Deportistas	+	Mejor absorción de micro y macro nutrientes (mayor consumo de probióticos)	+	Supermercados	=	Mejora la eficiencia en el consumo de vitaminas y minerales	Resultados físicos más rápidos (realización)	
Deportistas	+	Consumo de lácteos con menor cantidad de azúcar (lactosa).	+	Feria de salud, supermercados	=	Reduce el consumo de azúcar en la dieta		



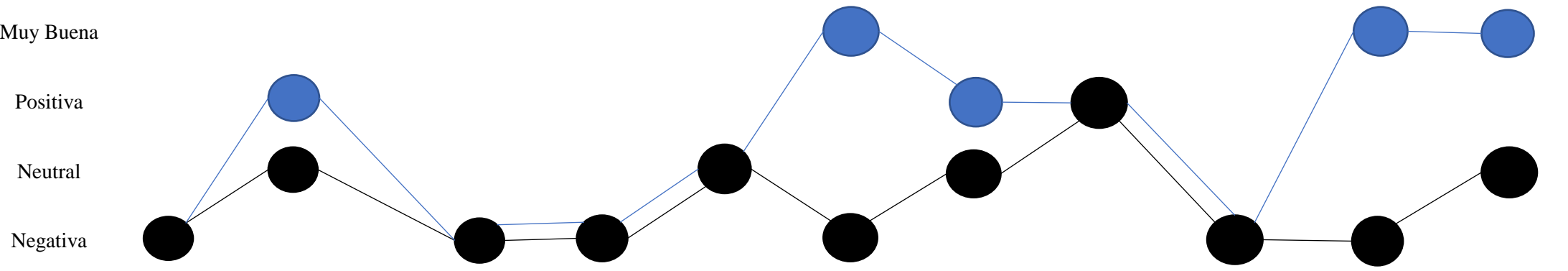
(Agregar más si fuera necesario).

Entregable 3.2.1, Kefir



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Punto de Contacto: Persistencia de Síntomas, Veo Publicidad, Reviso Pasillos del Super, Pregunto al Doctor, Pregunto a Familiares, Reviso Empaque etiqueta, Analizo consejos del vendedor, Compro el producto, Utilizo Producto, Recomiendo Producto, Contacto a Empresa



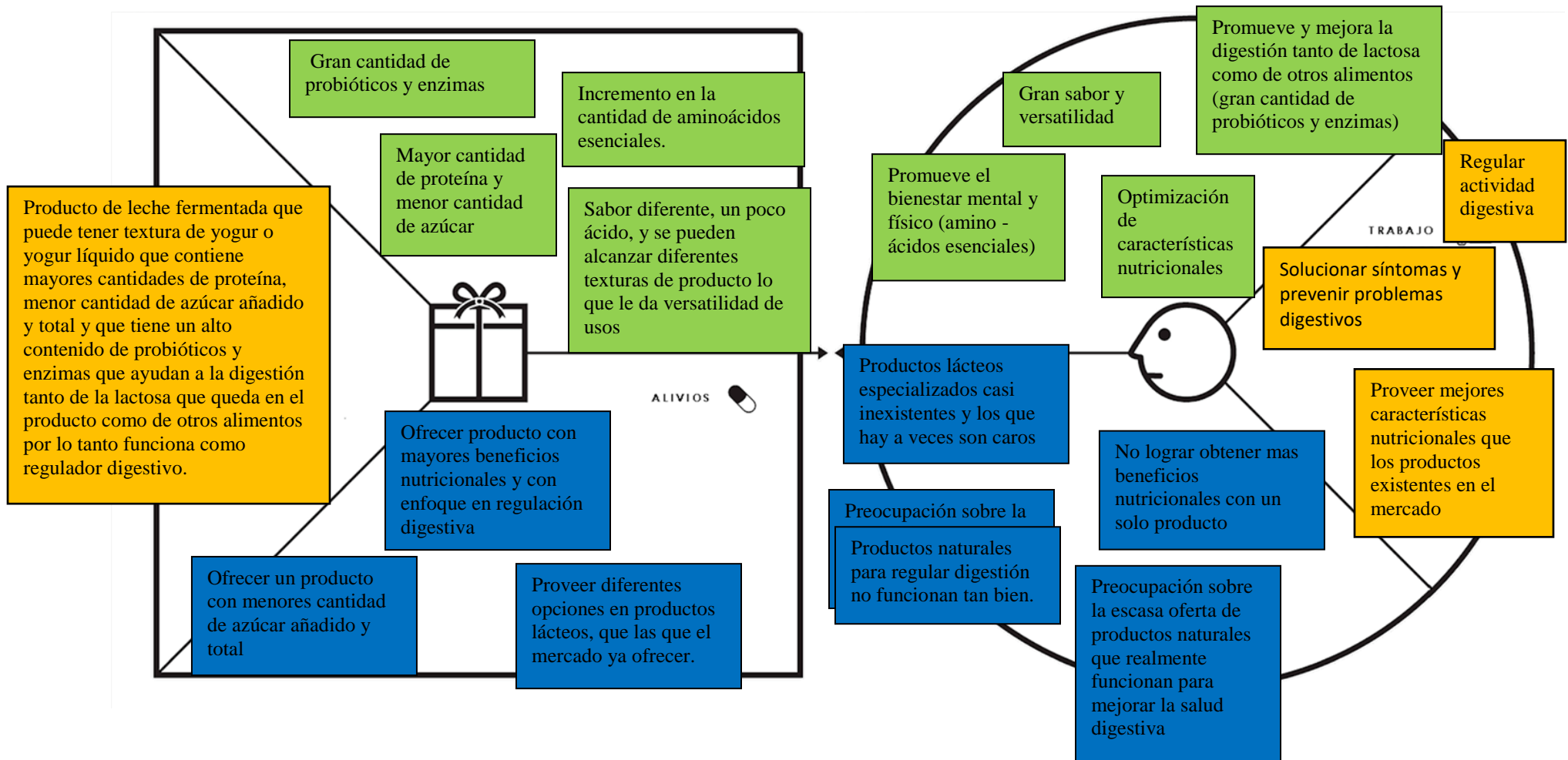
● Kefir
● Producto(s) Viejos(s)

Emociones y puntos de dolor: Desilusion, Vergüenza, Confianza, Curiosidad, Esperanza, Preocupacion de que no funcione para aliviar síntomas, Felicidad de que si funciona, Preferencia por medio de redes sociales (más interactivo)

Misma publicidad de siempre vs encontrar publicidad de productos nuevos que sirven para lo que se desea curar
 Poca variedad, Costoso, No tiene costo, Revision de cantidad de probioticos, Producto muy versátil, Tristeza de que no funciona, Contacto por telefono tedioso y lento



NOMBRE DEL PROYECTO: Kefir





POSICIÓN COMPETITIVA

NOMBRE DEL PROYECTO: Kefir

