



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

## **FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

### **CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

#### **DESARROLLO DE UN BIOPROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL A PARTIR DE LACTOSUERO EN POLVO Y GRÁNULOS DE KÉFIR**

##### **TESIS PREVIA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

**Autora: Paola Margarita Alvarado Córdor**

**Director: Ing. José Manuel Pais Chanfrau, PhD**

**Ibarra – Ecuador**

**Junio 2018**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**  
**DESARROLLO DE UN BIOPROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA**  
**BEBIDA FUNCIONAL A PARTIR DE LACTOSUERO EN POLVO Y**  
**GRÁNULOS DE KÉFIR**

Tesis revisada por los miembros del tribunal, por lo cual se autoriza su presentación  
como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

APROBADA:

Ing. José Manuel Pais Chanfrau, PhD  
**DIRECTOR DE TESIS**

  
.....  
**FIRMA**

Dra. Lucía Yépez  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

  
.....  
**FIRMA**

MSc. Jimmy Núñez  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

  
.....  
**FIRMA**

MSc. Silvio Alvarez  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

  
.....  
**FIRMA**



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

#### IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad. Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

<b>DATOS DE CONTACTO</b>	
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD</b>	100408671-4
<b>APELLIDOS Y NOMBRES</b>	Alvarado Cóndor Paola Margarita
<b>DIRECCIÓN</b>	Atuntaqui, Barrio San José, calle Río Amazonas
<b>EMAIL</b>	Paiito_alvarado93@hotmail.com
<b>TELÉFONO MOVIL</b>	0989273637
<b>DATOS DE LA AUTORA</b>	
<b>TITULO</b>	Desarrollo de un bioproceso para la obtención de una bebida funcional a partir de lactosuero en polvo y gránulos de kéfir
<b>AUTOR</b>	Paola Margarita Alvarado Cóndor
<b>FECHA</b>	2018-06-04
<b>PROGRAMA</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Pregrado <input type="checkbox"/> Posgrado
<b>TITULO POR EL QUE SE OPTA</b>	Ingeniera Agroindustrial
<b>DIRECTOR</b>	Ing. José Manuel Pais Chanfrau, PhD

## **AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD**

Yo, Paola Margarita Alvarado Córdor, con cédula de identidad número 100408671-4, en calidad de autora y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la ley de Educación Superior Artículo 144.

## **CONSTANCIAS**

La autora manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se ha desarrollado, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los cuatro días del mes de marzo del 2018

**Autora:**

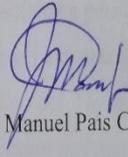


Paola Margarita Alvarado Córdor

CI. 100408671-4

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Paola Margarita Alvarado  
Córdor, bajo mi supervisión



Ing. José Manuel Pais Chanfrau, PhD

**DIRECTOR DE TESIS**

## DECLARACIÓN

Manifiesto que la presente obra es original y se desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, es original y que soy el titular de los derechos patrimoniales; por lo que asumo la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldré en defensa de la Universidad Técnica del Norte en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 4 días del mes de junio de 2018

Firma



Paola Margarita Alvarado Córdor

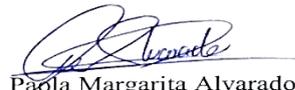
C.I: 1004086714

**CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
GRADO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL  
NORTE**

Yo, Paola Margarita Alvarado Córdor, con cédula de identidad Nro. 1004086714, manifiesto mi voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor de la obra o trabajo de grado denominado: Desarrollo de un bioproceso para la obtención de una bebida funcional a partir de lactosuero en polvo y gránulos de kéfir, que a sido desarrollado para obtener el título de: Ingeniera Agroindustrial en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra anteriormente citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

Ibarra, a los cuatro días del mes de junio del 2018

**Autora:**

  
Paola Margarita Alvarado Córdor  
C.I: 1004086714

## *AGRADECIMIENTOS*

*A Dios, por ser quien ilumina mis días llenándolos de bendiciones, experiencias y de aprendizajes; logrando en mí una persona con valores éticos y morales.*

*A mis padres Manuel Alvarado y Marcía Córdor, por ser los mejores guías o de lucha constante a pesar de las adversidad y caídas presentados al diario vivir. Por su total apoyo para cumplir mis metas.*

*A mis hermanos José Luis Alvarado y Katya Alvarado que al igual que mis padres son mi mayor ejemplo de perseverancia.*

*A mi director Dr. José País por brindarme su total apoyo y conocimientos durante todo el desarrollo de la investigación; mostrándose como un profesional.*

*Al Ing. Jimmy Cuarán, Dra. Lucía Yépez, MCs. Jimmy Núñez y Mcs. Silvio Álvarez, por su apoyo en el desarrollo de la investigación.*

*A la Universidad Técnica del Norte, por permitir el uso de equipos y laboratorios para el desarrollo de la investigación sin ningún costo.*

*Paola Margarita Alvarado C.*

## **DEDICATORIA**

### *A Dios*

*Por permitirme culminar esta etapa de mi vida, llena de conocimientos, vivencias y personas que quedaran siempre en mi memoria por el resto de mi vida.*

### *A mis padres y hermanos*

*Por ser las únicas personas que en cada momento de mi vida han estado a mi lado dándome las fuerzas necesarias para continuar de pie, a pesar de las innumerables caídas y errores que he tenido.*

*Paola Margarita Alvarado C*

## INDICE DE CONTENIDO

CÁPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. PROBLEMA .....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN .....	2
1.3. OBJETIVOS .....	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL .....	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
1.4. HIPÓTESIS .....	4
1.4.1. HIPÓTESIS NULA .....	4
1.4.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA .....	4
CÁPITULO II .....	5
MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. LACTOSUERO.....	5
2.1.1. CLASIFICACIÓN DEL SUERO DE LECHE.....	6
2.1.2. APLICACIONES Y BENEFICIOS DEL SUERO DE LECHE .....	7
2.2. FERMENTACIÓN .....	8
2.2.1. TIPOS DE FERMENTACIÓN .....	8
2.2.2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	10
2.3. KÉFIR.....	12
2.4. GRÁNULOS DE KÉFIR.....	12
2.4.1. KEFIRÁN .....	15
2.5. ALIMENTOS FUNCIONALES .....	17
2.5.1. PROBIÓTICOS .....	18
2.5.2. PREBIÓTICOS .....	18
2.5.3. RELACIÓN PREBIÓTICO-PROBIÓTICO .....	18
2.6. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA .....	19
2.7. ANÁLISIS SENSORIAL .....	22
CAPITULO III.....	24

MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
3.1. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO .....	24
3.1.1. UBICACIÓN .....	24
3.1.2. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO .....	24
3.1.3. CARACTERÍSTICAS CLIMATOLÓGICAS .....	24
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS .....	25
3.2.1. MATERIA PRIMA E INSUMOS .....	25
3.2.2. EQUIPOS .....	25
3.2.3. MATERIALES .....	25
3.3. METODOLOGÍA.....	26
3.3.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL KEFIRÁN OBTENIDO EN LA FERMENTACIÓN	26
3.3.2. FACTORES EN ESTUDIO .....	26
3.3.3. TRATAMIENTOS .....	27
3.3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
3.3.5. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	29
3.4. VARIABLES A EVALUAR.....	29
3.4.1. VARIABLES CUANTITATIVAS.....	29
3.4.2. VARIABLES CUALITATIVAS .....	31
3.5. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO.....	32
3.5.1. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE LOS TRATAMIENTOS.....	32
3.5.2. DIAGRAMAS DE BLOQUES Y DESCRIPCIÓN DE PROCESOS.....	34
3.6. EXTRACCIÓN DEL KEFIRÁN .....	36
CAPITULO IV.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	37
4.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL KEFIRÁN.....	37
4.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTIMOS DEL BIOPROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE KEFIRÁN, BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y pH EN LA BEBIDA FUNCIONAL.....	38
4.2.1. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DEL BIOPROCESO ..	40

4.2.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA EN TRES DIMENSIONES DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA.....	43
4.2.3. ANÁLISIS GRÁFICO DE LOS RESIDUOS DE LOS MODELOS PROPUESTOS PARA LAS VARIABLES DE RESPUESTA .....	46
4.2.4. OPTIMIZACIÓN DE LOS MODELOS SUGERIDOS PARA ENCONTRAR LOS PARAMETROS ÓPTIMOS (TEMPERATURA Y CONTENIDO DE LACTOSUERO EN POLVO) MEDIANTE LA FUNCIÓN DE DESABILIDAD.....	48
4.2.5. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO SUGERIDO PARA LA CONCENTRACIÓN DE KEFIRÁN Y SU PROCESO DE EXTRACCIÓN.	50
4.3. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERISTICAS FISICOQUÍMICAS, NUTRICIONALES Y SENSORIALES DEL PRODUCTO OBTENIDO .....	52
4.3.1. ANÁLISIS SENSORIAL .....	54
CAPITULO V .....	59
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	59
5.1. CONCLUSIONES .....	59
5.2 RECOMENDACIONES .....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	61
ANEXOS.....	68

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis químico comparativo de leche y suero de leche. ....	6
Tabla 2. Comparación nutricional del lactosuero dulce y ácido. ....	6
Tabla 3. Algunas aplicaciones y beneficios del lactosuero en alimentos. ....	7
Tabla 4. Tipos de fermentaciones y sus productos industriales. ....	9
Tabla 5. Bacterias encontradas en los gránulos de kéfir y leche fermentada. ....	14
Tabla 6. Levaduras encontradas en los gránulos de kéfir y leche fermentada. ....	14
Tabla 7. Ubicación del área de estudios. ....	24
Tabla 8. Características Climatológicas. ....	24
Tabla 9. Factor A (Temperatura (°C)) y Factor B (Contenido de suero de leche en polvo (SLP) (% m/m)). ....	26
Tabla 10. Tratamientos para la bebida funcional. ....	27
Tabla 11. Grados Brix de las soluciones madres. ....	32
Tabla 12. Formulaciones correspondientes al factor B. ....	33
Tabla 13. Concentraciones de glucosa (µg/ml). ....	37
Tabla 14. Resultados del Diseño Central Compuesto de variables independientes de respuesta ( $X_1$ : Temperatura y $X_2$ : % de SLP) junto con las respuestas predichas y reales de las variables dependientes. ....	40
Tabla 15. ANOVA para los modelos de segundo orden de la concentración de kefirán (K), población de BAL (L) y levaduras (Y), y reducción de pH (P) durante la fermentación. ....	41
Tabla 16. Coeficientes de regresión, intervalos de confianza ( $p < 0.05$ ) y el error estándar de cada modelo de regresión. ....	46
Tabla 17. Media ( $\bar{X}$ ) y desviación estándar (DE) de la maximización de los modelos matemáticos sugeridos de cada variable y la función de deseabilidad. ...	48
Tabla 18. Condiciones óptimas de las variables independientes que maximizan el modelo cuadrático de regresión de la concentración de kefirán. ....	50
Tabla 19. Resultados de las evaluaciones de las características físico-químicas y nutricionales de la bebida funcional realizada mediante los parámetros óptimos de deseabilidad. ....	52

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gránulos de Kéfir (Farnworth 2005). .....	13
Figura 2. Presentación del kefirán en polvo y en pastillas (Tomotari, 2015). .....	16
Figura 3. Estructura química del kefirán (Farnworth, 2005). .....	17
Figura 4. Representación y construcción de los DCC para $k = 2$ (superior) y $k = 3$ (inferior) (Gutiérrez & De la Vara Salazar, 2008). .....	21
Figura 5. Distribución de las variables de estudio en forma gráfica. ....	27
Figura 6. Curva de calibración de glucosa usada posteriormente para la cuantificación del kefirán. ....	38
Figura 7. Gráficos en 3D de la superficie de respuesta que muestran el efecto combinado de la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y la cantidad de SLP (% m/m) en la concentración de (A) Kefirán (mg Glu/ml); (B) Reducción de pH; (C) Población de BAL (UFC/ml); (D) Población de levaduras (UFC/ml). ....	44
Figura 8. Valores predichos vs valores reales de (A) concentración de kefirán (mg Glu/ml); (B) Reducción de pH durante la fermentación; (C) población de BAL (UFC/ml); (D) población de levaduras (UFC/ml). ....	47
Figura 9. Experimentos de validación para el modelo de la deseabilidad obtenido mediante la optimización de los modelos de las variables de respuesta. Los valores promedio se muestran en las columnas; las barras indican las desviaciones estándar y las letras iguales indica que no existe diferencias significativas. ....	49
Figura 10. Uno de los valores máximos sugeridos mediante la aplicación de optimización numérica para la concentración de kefirán. ....	51
Figura 11. Experimentos de validación para el modelo del kefirán. Los valores promedio se muestran en las columnas, las barras indican las desviaciones estándar y la letra igual indican que no existe diferencia significativa ( $n = 7$ , $p < 0.05$ ). ....	52
Figura 12. Resultados del análisis sensorial (textura, olor, sabor, color, aspecto y aceptabilidad) de la bebida funcional realizada mediante los parámetros óptimos de deseabilidad. ....	55
Figura 13. Representación gráfica del perfil sensorial de la bebida funcional .....	58

## **GLOSARIO DE TERMINOS**

**SL:** Suero de leche

**BAL:** Bacterias ácido-lácticas

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**EPS:** Exopolisacáridos

**MSR:** Metodología de superficie de respuesta

**DCC:** Diseño central compuesto

**SLP:** Suero de leche en polvo

**MRS:** Man rogosa and sharpe

**YPD:** Yeast Potato Dextrosa

**GLU:** Glucosa

## RESUMEN

El lactosuero es un subproducto de la industria láctea obtenido a partir de la fabricación de quesos. Se estima que contiene entre el 50 al 55% de los nutrientes de la leche. Por lo tanto, para la industria de alimentos se considera una materia prima para la obtención de sustancias con características funcionales y nutraceúticas. El objetivo en este estudio fue desarrollar un bioproceso para la obtención de una bebida funcional a partir de lactosuero en polvo y gránulos de kéfir. La metodología de superficie de respuesta mediante un diseño compuesto central fue usada para encontrar la combinación de temperatura (20.0, 22.3, 28.0, 33.7, 36.0 °C), y del contenido de lactosuero en polvo (38.5, 44.1, 57.8, 71.4, 77.0% m/m) con el fin de maximizar la concentración de kefirán, la población de bacterias ácido-lácticas (BAL), población de levaduras y la reducción de pH en la bebida funcional. Después de corroborar la validez de los modelos cuadráticos de cada variable, mediante una función de deseabilidad, se determinó que la maximización se obtiene a una temperatura de 29.3°C y 71.4% m/m de contenido de lactosuero en polvo, en el cual, se alcanzaron valores máximos de kefirán de 199.4 mg Glu/ml, de BAL  $9.74 \cdot 10^8$  UFC/ml, de levaduras  $4.53 \cdot 10^8$  UFC/ml y una caída de pH de 2,8. La validación del modelo de deseabilidad se realizó mediante 6 repeticiones a las mismas condiciones óptimas y se confirmó que no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con los valores brindados por el modelo. Posteriormente, se evaluó las características fisicoquímicas y nutricionales (proteína, grasa, acidez, lactosa, viscosidad, grado alcohólico), las cuales cumplen con los parámetros establecidos en la normativa NTA INEN y NTA ANDINA. El análisis sensorial se realizó con 10 panelistas semi-entrenados. La bebida contiene un penetrante, olor acético y sabor ácido, y una aceptabilidad de 1-3 de un máximo de cinco. Al considerar únicamente la maximización del kefirán se obtuvo un modelo en el cual la combinación óptima para la concentración de este prebiótico es de 25.0°C y un contenido de lactosuero de 44.1% (m/m) obteniendo una concentración de  $209.72 \pm 9.77$  mg Glu/ml. Se realizó la validación mediante 3 experimentos adicionales, obteniendo un resultado de  $216.06 \pm 14.40$  mg Glu/ml demostrando que no existió

diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ). A partir de 5 lotes de 100 ml de caldo fermentativo realizado bajo estas condiciones, se extrajo  $3.1 \pm 1.3$  g/l de kefirán.

**Palabras claves:** Suero de leche en polvo, kéfir, kefirán, Diseño central compuesto, optimización.

## SUMMARY

Whey is a derivative of the dairy industry obtained from the manufacture of cheeses. It is estimated that it contains between 50 to 55% of the nutrients in milk. Therefore, for the food industry it is considered a raw material for obtaining substances with functional and nutraceutical characteristics. The objective in this study was to develop a bioprocess to obtain a functional drink from whey powder and kefir grains. The response surface methodology using a central composite design was used to find the temperature combination (20.0, 22.3, 28.0, 33.7, 36.0 ° C), and the whey powder content (38.5, 44.1, 57.8, 71.4, 77.0 % m / m) this in order to maximize the concentration of kefirán, the concentration of lactic acid bacteria (LAB), the concentration of yeasts and the reduction of pH in the functional drink. After corroborating the validity of the quadratic models of each variable, by means of a function of desirability, it was determined that the maximization is obtained at a temperature of 29.3 ° C and 71.4% m / m of whey content in powder, which, maximum kefirán values of 199.4 mg Glu / ml, LAB  $9.74 \cdot 10^8$  CFU / ml, yeast  $4.53 \cdot 10^8$  CFU / ml and a pH drop of 2.8 were reached. The validation of the desirability model was carried out through 6 repetitions at the same optimal conditions and it was confirmed that there is no significant difference ( $p \leq 0.05$ ) with the values provided by the model. Subsequently, the physicochemical and nutritional characteristics (protein, fat, acidity, lactose, viscosity, alcoholic degree) were evaluated, which comply with the parameters established in the NTA INEN and NTA ANDINA regulations. The sensory analysis was performed with 10 semi-trained panelists. The drink contains a penetrant, acetic odor and acid taste, and an acceptability of 1-3 out of a maximum of five. Considering only the maximization of the kefirán, a model was obtained in which the optimum combination for the concentration of this prebiotic is 25.0 ° C and a whey content of 44.1% (m / m) obtaining a concentration of  $209.72 \pm 9.77$  mg Glu / ml. Validation was carried out through 3 additional experiments, obtaining a result of  $216.06 \pm 14.40$  mg Glu / ml demonstrating that there was no significant difference ( $p \leq 0.05$ ). From 5 batches of 100 ml of fermentative broth made under these conditions,  $3.1 \pm 1.3$  g / l of kefirán was extracted.

**Key words:** whey powder, kefir, kefiran, central composite design, optimization.

# CÁPITULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. PROBLEMA

En la Zona 1 del Ecuador (Carchi, Imbabura, Esmeraldas y Sucumbíos), la actividad agrícola y ganadera ocupa una parte importante de la actividad económica y laboral de estos territorios, siendo la provincia del Carchi la que más se destaca con un aporte del 4.8% de la producción nacional de leche, alcanzando una producción diaria de alrededor de 79.8 m<sup>3</sup> (Requelme & Bonifaz, 2012).

El SL es un residual obtenido de la producción de quesos en la industria láctea (Machado, 2013). Éste representa entre el 80-90% del volumen de la leche utilizada en la fabricación de quesos y se lleva consigo entre el 50-55% de todos los nutrientes de la leche (Rimada, 2001).

En el Ecuador, existe poco aprovechamiento del SL para generar productos de valor agregado importantes para la industria en general. Una pequeña cantidad de lactosuero se emplea para alimentar animales, ingredientes de productos lácteos y el resto es desechado (Aspasia, Chatzipaschali, & Anastassios, 2012).

Por lo tanto, el lactosuero pudiera representar una pérdida apreciable para los productores de leche, si como la ley los obliga, debería ser tratado este subproducto en plantas de tratamiento de residuales antes de ser enviados a las plantas de tratamiento de agua convencionales.

A demás, la falta de aprovechamiento del SL en el Ecuador incide a que exista poca investigación sobre los productos que se pueden obtener mediante procesos óptimos fermentativos del SL, tal es el caso, la producción de probióticos y prebióticos permitiendo obtener alimentos y bebidas con características funcionales mediante la fermentación con microorganismos específicos.

Por otra parte, el kéfir es una bebida fermentada láctea muy popular en el centro y este de Europa (Carneiro, 2010). Se obtiene por la acción de los gránulos de kéfir que están formados por un consorcio de bacterias ácido-lácticas y levaduras denominados probióticos, capaces de producir productos bioactivos beneficiosos para la salud como el kefirán (Olivera, 2011). Sin embargo, en Ecuador los beneficios que otorga este producto funcional son escasamente conocidos.

El problema por investigar consiste en encontrar las condiciones en que se maximice la producción de prebióticos (kefirán) y se obtenga los más altos niveles de población de microorganismos probióticos que forman parte del gránulo de kéfir en una bebida a base de lactosuero.

## **1.2. JUSTIFICACIÓN**

El SL es una fuente rica de nutrientes como son la lactosa, el ácido láctico, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Pamesar et al., 2007). Éste presenta un interesante panorama para la industria debido a la posible transformación del SL en productos de mayor valor agregado. Una de las vías para disminuir las pérdidas en que incurrirían los productores de queso al tener que tratar este subproducto en plantas de tratamiento, es mediante la utilización del SL como materia prima de partida para la obtención de bioproductos útiles de mayor valor agregado (Ramírez, 2011).

Dentro de los procesos para transformar el lactosuero a bioproductos, se considera a la fermentación como una alternativa económica, debido a los costos que este proceso representa. Dentro de la gama de productos útiles obtenidos mediante un proceso fermentativo, se encuentran los prebióticos que son sustancias metabolizables por las bacterias beneficiosas del tracto intestinal y los probióticos que son microorganismos que confieren beneficios a la salud humana (FAO, 2001).

La nutrición actual está enfocada a la prevención de las enfermedades crónicas; debido a esto, los consumidores esperan a través de los alimentos ingeridos, alcanzar o mantener la salud y el bienestar (Araya, 2003). Por lo cual, los alimentos funcionales se encuentran en auge debido a su crecimiento en el consumo.

Para que los alimentos funcionales confieran su efecto beneficioso en la salud humana, sus compuestos bioactivos deben estar presentes en las cantidades adecuadas. Por ello, es importante encontrar, las condiciones en las cuales se logre maximizar la producción de prebióticos y probióticos en una bebida funcional a partir de lactosuero.

## **1.3. OBJETIVOS**

### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un bioproceso para la obtención de una bebida funcional a partir de lactosuero en polvo y gránulos de kéfir.

### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Validar la técnica analítica para la cuantificación de kefirán obtenido en la fermentación.
- Determinar los parámetros óptimos del bioproceso para la obtención de kefirán, bacterias ácido-lácticas (BAL), levaduras y pH en la bebida funcional.
- Evaluar las características fisicoquímicas, nutricionales y organolépticas del producto obtenido.

## **1.4. HIPÓTESIS**

### **1.4.1. HIPÓTESIS NULA**

Los modelos matemáticos aplicados no permiten obtener parámetros óptimos de fermentación de lactosuero mediante gránulos de kefir con el fin de desarrollar un bioproceso para obtener una bebida con características funcionales.

### **1.4.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

Los modelos matemáticos aplicados permiten obtener parámetros óptimos de fermentación de lactosuero mediante gránulos de kefir con el fin de desarrollar un bioproceso para obtener una bebida funcional con características probióticas y prebióticas.

## **CÁPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

La transformación de los subproductos de la industria láctea se realiza con el fin de obtener nuevos productos con mayor valor agregado. Tal es el caso del lactosuero o suero de leche, el principal subproducto de la producción de queso, el cual, a través de diversos bioprocesos puede ser convertido en diversos productos (alimentos funcionales, probióticos, prebióticos, biocombustibles, biopolímeros, etc.) (Aspasia, Chatzipaschali, & Anastassios, 2012; Chanfrau et al., 2017). Esto permitiría no solo disminuir la carga contaminante de la industria láctea, sino también contribuiría al desarrollo de la industria láctea, al disponer de nuevos productos y procesos, así como impulsaría el desarrollo de investigaciones en el Ecuador.

#### **2.1. LACTOSUERO**

El lactosuero o suero de leche (SL) es un subproducto líquido, ligeramente amarillento, obtenido de la separación de la leche cuando ocurre el cuajado durante la elaboración de quesos (Aspasia, Chatzipaschali, & Anastassios, 2012). Este subproducto, contiene todos los componentes de la leche que no se integran en la coagulación de la caseína mediante enzimas o ácidos minerales u orgánicos (Valencia & Ramírez, 2009), teniendo como resultado, un subproducto que contiene buenas características nutricionales en comparación a la leche, tal como se describe en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Análisis químico comparativo de leche y suero de leche.

	Componentes % (m/v)	
	Leche	Suero
<b>Caseínas</b>	2.8	<0.1
<b>Proteínas</b>	0.7	0.7
<b>Lípidos</b>	3.7	0.1
<b>Cenizas</b>	0.7	0.5
<b>Lactosa</b>	4.9	4.9
<b>Sólidos totales</b>	12.8	6.3

Fuente: (Londero, 2012)

El SL que no se recolecta para su posterior utilización, pasa a formar parte de las aguas residuales, incrementando significativamente la carga contaminante de toda la industria, debido principalmente a la elevada carga orgánica que el SL aporta (40-80 g O<sub>2</sub>/L). (Urquiza, Mendez, & Vélez, 2014).

### 2.1.1. CLASIFICACIÓN DEL SUERO DE LECHE

La composición nutricional del SL varía debido a varios factores, tales como: las características de la leche, el tipo de queso que se va producir, el proceso tecnológico implementado (Hernández & Vélez, 2014) y del pH al que el SL se separa de la cuajada (Pescuma, Valdez, & Mozzi, 2015).

El SL se clasifica principalmente en lactosuero dulce o ácido. El SL dulce se obtiene por la coagulación de la leche por medio de enzimas o cuajo, alcanzando un pH 6.5. Por otro lado, el SL ácido se genera por la precipitación ácida de la caseína, la cual logra disminuir el pH a 4.5 - 4.6 (Jovanovic, Barac, & Macej, 2005). La composición de los macronutrientes en el lactosuero dulce y ácido es muy similar (Aspasia, Chatzipaschali, & Anastassios, 2012) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Comparación nutricional del lactosuero dulce y ácido.

Componentes	Suero de leche dulce (g/l)	Suero de leche ácido (g/l)
Sólidos Totales	63-70	63-70
Lactosa	46-52	44-46
Proteína	6-10	6-8
Grasa	0.5-0.1	0.5-0.7
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fosfatos	1.0-3.0	2.0-4.5
Lactato	2.0	6.4
Cloruros	1.1	1.1

Fuente: (Aspasia, Chatzipaschali, & Anastassios, 2012)

Por su parte, el SL en polvo (SLP), conserva las propiedades del lactosuero por más tiempo (Londero, 2012). El proceso típico de su obtención incluye el tratamiento del SL por la tecnología de membranas, por medio de ultrafiltración, ósmosis inversa, seguido de la concentración, por medio de la evaporación y para finalizar, el secado por atomización (Chanfrau et al., 2017).

### 2.1.2. APLICACIONES Y BENEFICIOS DEL SUERO DE LECHE

Las aplicaciones del suero de leche abarcan tecnologías de uso en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmetológica y en producción de biocombustibles (Hernández & Vélez, 2014). En la industria alimenticia, las aplicaciones del lactosuero tiene variados beneficios (Tabla 3).

**Tabla 3.** Algunas aplicaciones y beneficios del lactosuero en alimentos.

<b>APLICACIONES</b>	<b>ALGUNOS BENEFICIOS</b>
Productos de panadería	Incrementar el valor nutricional, funcionar como emulgente, reemplazar la adición de huevo, dar cuerpo a la masa.
Quesos	Incrementar el valor nutricional, funcionar como emulgente, funcionar como gelificante, mejorar propiedades organolépticas, mejorar consistencia, incrementar la cohesividad.
Bebidas	Incrementar el valor nutricional, mejorar la solubilidad, mejorar la viscosidad, mejorar la estabilidad coloidal
Postres	Funcionar como emulgente, dar cuerpo y textura a los productos
Confitería	Funcionar como emulgente y facilitar el batido
Productos cárnicos	Funcionar como pre-emulgente, funcionar como gelificante, mejorar solubilidad
Otros	Alimentos con mayor valor nutricional y bajo costo, alimentos para deportistas, para personas de tercera edad, fórmulas infantiles, formulas especiales para alimentación hospitalaria.

Fuente: (Hernández & Vélez, 2014)

Según Pustaña (2012), las bebidas fermentadas a partir del lactosuero son una alternativa para la aplicación de este subproducto, creando alimentos con alto valor nutritivo y de bajo costo, debido a que, los procesos fermentativos que les dan lugar generalmente no conllevan costos elevados en el proceso de su elaboración.

## **2.2. FERMENTACIÓN**

La fermentación es una técnica utilizada desde la antigüedad en la conservación y procesamiento de alimentos, con el fin de brindar sabores, texturas y aromas característicos en productos fermentados de origen animal, vegetal (Lanming, Shuang, & Yingjie, 2015).

Los procesos fermentativos se consideran como procesos bioquímicos que dan lugar a la transformación de materias orgánicas en productos de interés como, por ejemplo, el ácido láctico y el alcohol etílico; mediante la acción de microorganismos específicos tales como mohos, bacterias y levaduras (Tortora, Funke, & Case, 2007). Además, tiene lugar en ambientes anaeróbicos, o parcialmente anaeróbicos, en los cuales se libera energía por medio de la oxidación de los hidratos de carbono (Vanaclocha & Requena, 2003).

Un proceso fermentativo inicia con la glicólisis, que comprende un conjunto de reacciones bioquímicas que permiten que los microorganismos bio-transformen los azúcares en ácido pirúvico. A partir del ácido pirúvico, las rutas metabólicas difieren, según se trate, de una fermentación alcohólica o láctica (Vanaclocha & Requena, 2003).

### **2.2.1. TIPOS DE FERMENTACIÓN**

Los tipos de fermentación depende de varios factores tales como: los microorganismos empleados, las características del sustrato, el tipo de azúcar a ser metabolizado y las condiciones a las cuales se realizará la fermentación como por ejemplo los tipos de fermentación presentados en la Tabla 4 (Puerta, 2010).

**Tabla 4.** Tipos de fermentaciones y sus productos industriales.

<b>Tipo de fermentación</b>	<b>Microorganismos fermentadores</b>	<b>Sustratos</b>	<b>Productos</b>
Alcohólica o etanólica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. ellipsoideus</i> , <i>S. anamensis</i> , <i>S. carlsbergensis</i> , <i>Candida seudotropicalis</i> , <i>Torulopsis spp</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Saccina Ventriculi</i> , <i>Zymomonas mobilis</i>	Malta de cebada, cereales, arroz, maíz, trigo, caña de azúcar, melaza, sorgo, jugo de frutas, remolacha, suero de leche, soya	Etanol, vinos, cerveza, licores, bebidas destiladas, pan, salsas
Láctica homofermentativa	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>Peddiococcus cerevisiae</i> y por la mayoría de los lactobacillus como <i>L. Lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i>	Leche, suero de leche, vegetales, sacarosa	Yogur, suero de leche, quesos, mantequilla, kumis, encurtidos
Láctica heterofermentativa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>L. fermenti</i> , <i>Bifidobacterium bifidus</i>	Leche, suero de leche, vegetales, sacarosa	Yogur, suero de leche, quesos, mantequilla, kumis, encurtidos
Propiónica o propanoica	<i>Propionibacterium freundenreichii</i> , <i>P. Shermanii</i> , <i>P. pentosaceum</i> , <i>Micrococcus lactylicus</i> , <i>Clostridium propionicum</i> , entre otras.	Productos lácteos, glucosa, sacarosa, lactosa, pentosas, ácido láctico, ácido málico, glicerina	Ácido propiónico, ácido acético y otros ácidos
Butírica o butanoica	<i>Clostridium butyricum</i> y <i>Clostridium spp.</i>	Polisacáridos (almidón, glucógeno, pectina), glucosa, proteínas, aminoácidos, purinas, etanol, ácido úrico, xantina	Ácido butírico, acético, fórmico, láctico, succínico, butanol y otros alcoholes y cetonas
Fórmica o ácidomixta	<i>Enterobacter spp</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aerobacter aerogens</i> , <i>Erwinia spp.</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella thyphi</i> , <i>Shigella spp</i> , y las bacterias luminosas	Glucosa o galactosa	Ácido acético, láctico, málico, fórmico, vinagre, glicerina y disolventes
Metánica	<i>Methanobacterium omelianskii</i> , <i>M. formicium</i> y <i>M. ruminantium</i> , <i>Methanosarcina methanica</i> , <i>M. barkeri</i> , <i>Methanococcus mazei</i> y <i>M. vannielii</i>	Alcoholes, ácidos, CO <sub>2</sub>	Gas metano
Maloláctica	<i>Leuconostoc oenos</i>	Ácido málico	Vinos blancos y rojos, cidra

Fuente: (Puerta, 2010)

La fermentación ácido láctica es la fermentación que interviene en la producción de alimentos fermentados a partir de materias primas de origen animal. Consiste en la transformación de la lactosa en ácido láctico mediante la acción de bacterias ácido lácticas como lactobacilos y enterobacterias (Erickson, Fayet, Kakumanu, & Lawrence, 2004).

La fermentación ácido láctica se subdivide, en relación con el metabolito que produce en homofermentativa y heterofermentativa. Entonces, el ácido láctico se considera como el único producto final de una homofermentación y en otras ocasiones, además, se obtiene otros metabolitos secundarios como el lactato, etanol y acetato mediante una fermentación heterofermentativa (Vanaclocha & Requena, 2003).

### **2.2.2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son un grupo de bacterias anaerobias facultativas, representadas por varios géneros con características morfológicas, metabólicas y fisiológicas comunes (Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa, & Arce, 2011). Generalmente, las BAL, son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrato y su principal producto es el ácido láctico (Vázquez, Suárez, & Zapata, 2009).

Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y depende de las características del microorganismo utilizado, así como, también de las condiciones ambientales (Parra, 2010). Además, las BAL se adaptan bien tanto a pH bajos (pH 3.2), como a pH altos (pH 9.6); teniendo como pH óptimo para su desarrollo, un pH 4 - 4.5 (Vázquez, Suárez, & Zapata, 2009).

La clasificación de las BAL se basa según varios aspectos como: morfología, fermentación de la lactosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, el ácido láctico producido y la habilidad de desarrollarse en medios alcalinos y ácidos (Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa, & Arce, 2011).

Schneider et al. (2006), explica que las principales funciones de las BAL en la industria de alimentos fermentados son: formación de sabor ácido, inhibición de organismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa,

aroma, producción de gas y alcohol en productos como: quesos, yogur, kumis, kéfir, embutidos, chucrut, entre otros; así como también, han sido utilizadas como probióticos.

#### **2.2.2.1. Clasificación de las Bacterias Ácido Lácticas**

Según la fermentación de la lactosa, las BAL se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas. Las homofermentativas, son un grupo de bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus spp.* (Parra, 2010). Las BAL pertenecientes a este grupo producen ácido láctico mediante la acción de la enzima aldolasa (Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa, & Arce, 2011). Las bacterias homofermentativas mediante sus rutas metabólicas convierten 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico. Además, producen más del 85% de ácido láctico a partir de la glucosa (Parra, 2010).

Las bacterias heterofermentativas son un grupo de bacterias que está comprendido de miembros de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillos*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus spp.* Estas bacterias contienen la enzima fosfocetolasa, por la cual, usan la vía metabólica de la hexosa monofosfato o la de la pentosa (Hugenholtz, 2008).

Además de ácido láctico, estas bacterias producen ácido acético y/o etanol mediante el cambio de hexosas a pentosas por la vía metabólica 8-fosfogluconato-fosfocetolasa (Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa, & Arce, 2011). Mediante sus rutas metabólicas estas bacterias forman 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO<sub>2</sub> mediante la fermentación de 1 mol de glucosa (Parra, 2010).

Las BAL también se clasifican en mesófilas y termófilas, dependiendo de la temperatura óptima de crecimiento bacteriano. Las mesófilas, tienen como temperatura de incubación ideal entre 20 a 25°C, mientras que las termófilas su temperatura óptima oscila entre 40 a 45°C (Blanco, Delahaye, & Fraganas, 2006).

### **2.3. KÉFIR**

El kéfir es una bebida tradicional cuyo origen se atribuye a las tribus caucásicas que habitaban en la antigua Rusia (Rosa, et al. 2017). Es una bebida láctea fermentada, refrescante y levemente carbonatada, con un sabor único debido a la mezcla de ácido láctico, acetaldehídos, acetonas, baja en alcohol debido a las fermentaciones alcohólica (Guzel, Tugba, & Greene, 2010).

Se produce por la inoculación en la leche fresca de los gránulos de kéfir, durante un tiempo y a la temperatura adecuada. Desde el punto de vista nutricional aporta minerales, aminoácidos esenciales, vitaminas y proteínas que son de fácil digestión (Farnworth, 2005).

Además, el kéfir, es considerado un alimento probiótico ya que aporta microorganismos que se establecen en el tracto digestivo y contribuyen en la digestión (Olivera, 2011). Investigaciones realizadas indican que tiene propiedades benéficas que incluye el mejoramiento de la digestión, incremento a la tolerancia a la lactosa, anti-inflamatorio, actividad antioxidante, actividad anticancerígena, así como también, se ha notado actividad antimicrobiana y antifúngica (Assadi, 2008).

La composición del kéfir es muy variada, ya que depende de factores, tales como, el origen y almacenamiento del gránulo de kéfir, el tipo de leche utilizada, el tiempo y la temperatura de fermentación (Lopitz, Elguezabel, & Garaizar, 2006).

### **2.4. GRÁNULOS DE KÉFIR**

Los gránulos de kéfir (Fig. 1), son los responsables de la fermentación de la leche para la producción de kéfir. Además, tienen forma similar a una coliflor, son elásticos, gelatinosos, de color blanco y de forma variada, y poseen, entre 0.3 a 3.5 cm de diámetro (Fig. 1) (Farnworth, 2005). El gránulo de kéfir contiene aproximadamente 83% de agua, 4-5 % de proteínas y 9-10% de un polisacárido denominado kefirán (Garrote, 2010). La microflora presente en el gránulo de kéfir incluye numerosas especies de BAL ( $10^8$ - $10^9$  UFC/g), bacterias acéticas ( $10^5$ - $10^6$  UFC/g) y levaduras ( $10^7$ -  $10^8$  UFC/g).



**Figura 1.** Gránulos de Kéfir (Farnworth 2005).

Una gran variedad de especies de bacterias y levaduras han sido aisladas e identificadas en el gránulo de kéfir siendo el *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefiranofaciens* y *Lactobacillus keffiri* los más predominantes. En el caso de las levaduras, se encontraron con mayor frecuencia a *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Candida kefir* y *Kluyveromyces marxianus subsp. Marxianus* (Lopitz, Elguezabel & Garraizar, 2006).

Los gránulos de kéfir forman complejas asociaciones simbióticas, caracterizadas por la interacción entre levaduras y bacterias ácido lácticas que pueden influenciar en la calidad del kéfir (Pogacic, Sinko, Zamberlin, & D, 2013). Las actividades entre estos microorganismos contribuyen a un equilibrio simbiótico, es decir, compiten por nutrientes o pueden producir metabolitos que inhiben o estimulen el crecimiento mutuo (Assadi, 2008).

La composición microbiana del gránulo de kéfir comprende entre un 65 a 80% de *Lactobacilos sp.* y *Lactococcus sp.* (Tabla 4) y el resto de su composición, está formada por diversas levaduras (Tabla 5) (Chen, Wang & Chen, 2008). La composición de este gránulo varía, existiendo algunos microorganismos que siempre se hallan en los diversos gránulos y otros, cuya presencia depende del origen del mismo, las condiciones de cultivo y las características del sustrato (Hernández, Robles, Angulo, De la Cruz, & Garcia, 2007).

**Tabla 5.** Bacterias encontradas en los gránulos de kéfir y leche fermentada.

<b>BACTERIAS ENCONTRADAS EN LOS GRÁNULOS DE KÉFIR</b>	
	<i>Lactobacillus kefir</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	<i>Lactobacillus kefirgranum</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus parakefir</i>
	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<b>Lactobacilos</b>	<i>Lactobacillus brevis</i>
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus viridescens</i>
	<i>Lactobacillus gasserii</i>
	<i>Lactobacillus crispatus</i>
<b>Lactococos</b>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremonis</i>
<b>Estreptococos</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	<i>Streptococcus durans</i>
<b>Leuconostoc</b>	<i>Leuconostoc durans</i>
<b>Enterococos</b>	<i>Enterococcus durans</i>
<b>Bacterias ácido acéticas</b>	<i>Acetobacter</i> sp.
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<b>Otras bacterias</b>	<i>Bacillus</i> spp
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Pseudomonas</i> spp

Fuente: (Londero, 2012)

**Tabla 6.** Levaduras encontradas en los gránulos de kéfir y leche fermentada.

<b>LEVADURAS ENCONTRADAS EN LOS GRÁNULOS DE KÉFIR</b>	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida friedrichii</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Saccharomyces</i> sp	<i>Candida tenuis</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>Saccharomyces unisporus</i>	<i>Candida maris</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Saccharomyces turicensis</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Saccharomyces delbrueckii</i>	<i>Candida tannotelerans</i>
<i>Saccharomyces dairensis</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Saccharomyces humaticus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Brettanomyces anomalus</i>	
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	
<i>Pichia fermentans</i>	
<i>Kazachstania exigua</i>	
<i>Kazachstania unispora</i>	

Fuente: (Londero, 2012)

La presencia de levaduras en la fermentación de kéfir es crucial para las propiedades deseables como la producción de dióxido de carbono y etanol (Zeynep, Tugba, &

Greene, 2010). Las propiedades de las levaduras en el kéfir varían de acuerdo al origen del gránulo, por ejemplo, algunas levaduras encontradas en el gránulo de kéfir son capaces de fermentar la lactosa, mientras que, la mayoría de las levaduras presentes, son capaces de utilizar la galactosa, lactato o citrato (Londero, 2012).

Los microorganismos presentes en los gránulos de kéfir se reactivan mediante incubaciones sucesivas en la leche pasteurizada o reconstituidas (Kilic, Demirhan, Ozel & Ozbek, 2015). El crecimiento de los gránulos de kéfir es lento; considerando, que en un proceso de obtención de kéfir estos microorganismos se desarrollan a temperaturas que oscilan entre 18 a 30°C y en un tiempo estimado de 24 a 48 h de fermentación (Vedamuthu, 2013).

#### **2.4.1. KEFIRÁN**

Los exopolisacáridos (EPS) son macromoléculas de carbohidratos, que se sintetizan generalmente junto con las proteínas, por las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc spp.*; y se excretan y acumulan extracelularmente dando al cultivo un aspecto mucilaginoso (Zolfi, Mousavi, & Hashemi, 2014).

Estos hidratos de carbono confieren propiedades de protección y adaptación a sus productores bacterianos; dado que a menudo están unidos a la membrana celular, por lo tanto, se pierden fácilmente en su entorno (Hiroaki, Xia, Shiho, Kiyosaki, & Shinichi, 2004).

Los EPS poseen propiedades fisicoquímicas y reológicas interesantes, las cuales, pueden ser utilizadas en la industria como estabilizantes, emulsionantes, gelificantes y mejoradores de la viscosidad (Piermaria et al., 2011). Además, algunos EPS poseen actividad biológica, pues aportan sus efectos como agentes antioxidantes, antitumorales, antimicrobianos e inmunomoduladores (Papavasoliou, Rapti, Sipsas, Soupioni, & Kourtinias, 2007).

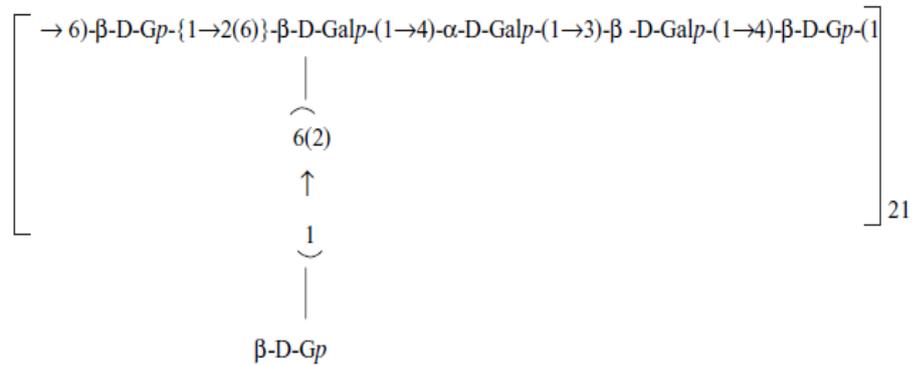


**Figura 2.** Presentación del kefirán en polvo y en pastillas (Tomotari, 2015).

El primer estudio realizado para la determinación de exopolisacáridos producido por el gránulo de kéfir fue realizado por La Riviere et al. (1967). Este exopolisacárido, llamado kefirán (Fig. 2), es producido por el *Lactobacillus kefiranofaciens* o *Lactobacillus kefir* presentes en el gránulo de kéfir, formando una bio-película visible en el exterior de los gránulos de kéfir (Olivera, 2011).

Las BAL presentes en el gránulo de kéfir han demostrado su capacidad de producción de kefirán en diferentes condiciones (Vedamuthu, 2013). De hecho, se ha mostrado que la producción de este exopolisacárido ha sido cuando dichas bacterias crecen en un cultivo mixto junto con levaduras; especialmente *Saccharomyces cerevisiae* (Zolfi, Mousavi, & Hashemi, 2014), demostrando la importancia de la simbiosis entre bacterias y levaduras en el gránulo de kéfir para la producción de este prebiótico.

El kefirán posee interesantes propiedades funcionales y puede obtenerse sencillamente a partir de gránulos de kéfir crecidos en un medio de bajo costo como el suero de leche (Zavala, Piermaria, & Abraham, 2012) y de esta manera se crearían alimentos funcionales a partir de este subproducto.



**Figura 3.** Estructura química del kefirán (Farnworth, 2005).

El kefirán contiene unidades de D-glucosa y D-galactosa en proporción de 1:1 (La Riviere & Kooiman, 1967). Una técnica analítica para la cuantificación de este exopolisacárido es mediante espectrofotometría, previamente realizando curvas patrón de glucosa o galactosa (Sabokbar, Moosavi-Nasab, & Khodaiyan, 2015). Además la extracción de este exopolisacárido es un proceso fácil de realizarlo mediante la técnica reportada por (Rimada & Abraham, 2001). Por otra parte, la cuantificación de este exopolisacárido se y Las reacciones de hidrólisis seguidas por análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear han sido utilizadas para determinar la estructura química del kefirán (Fig. 3) (Farnworth, 2005).

## 2.5. ALIMENTOS FUNCIONALES

Los alimentos funcionales son diseñados especialmente con componentes que pueden afectar funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico más allá de su valor nutritivo tradicional (Araya, 2003). El efecto que estos alimentos aporten debe contribuir a la mantención y bienestar de la salud y/o la disminución del riesgo de contraer enfermedades (Olagnero, Abad, Bendersky, Genovois, & Montonati, 2007).

El SL puede ser considerado como materia prima de partida para la elaboración de alimentos funcionales, debido a que sus componentes, pueden tener efectos beneficiosos, tales como, actividad antimicrobiana y antiviral, actividad inmuno-moduladora, actividad anti-cancerígena y beneficios para la salud cardiovascular (Hernández & Vélez, 2014).

### **2.5.1. PROBIÓTICOS**

Durante las últimas décadas, los probióticos han sido considerados como microorganismos vivos que al ser consumidos en cantidades apropiadas confieren beneficios para la salud (FAO, 2016). Su adición a varios tipos de alimentos, tales como, leches fermentadas, quesos, mantequilla y otros derivados lácteos, ha proliferado considerablemente en la actualidad (FAO, 2016).

La incorporación de los probióticos dentro de los procesos productivos debe contar con características tecnológicas que garanticen su viabilidad en el producto, sin alterar las propiedades sensoriales y de calidad del mismo. Factores como el contenido de grasa, la concentración y el tipo de proteínas, azúcares y pH del producto pueden afectar el crecimiento y supervivencia de los probióticos en los alimentos (Saarela, Mogensen, Fondén, Matto, & Mattila-Sandholm, 2000). Algunos de los probióticos empleados con mayor frecuencia, han sido del género *Lactobacilli spp.*, tales como *Lactobacillus acidophilus*, y las bifidobacterias.

### **2.5.2. PREBIÓTICOS**

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta que estimulan el crecimiento o la actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon. Los alimentos simbióticos combinan en sus formulaciones la unión de prebióticos y probióticos, lo que permite aprovechar más los beneficios de esa simbiosis (Rig & Blanco, 2002).

### **2.5.3. RELACIÓN PREBIÓTICO-PROBIÓTICO**

Es función de la microflora intestinal, fundamentalmente las bifidobacterias y los lactobacilos, es la producción de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico, como consecuencia de la fermentación de carbohidratos no digeribles. Estos productos disminuyen el pH en el colon creando un ambiente donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse. Por lo cual, constituyen el sustrato fundamental de las bacterias probióticas (Rig & Blanco, 2002).

La combinación de prebióticos con probióticos se ha definido como simbiótico, y su consumo beneficia al huésped mediante el aumento de la sobrevivencia e implantación de los microorganismos vivos probióticos de los suplementos

dietéticos en el sistema gastrointestinal (FAO, 2016). Aún está poco estudiada esta combinación, que podría aumentar la supervivencia de las bacterias probióticas en su fase de tránsito intestinal, por tanto, incrementaría su potencialidad para desarrollar sus funciones benéficas en el colon. Se ha descrito un efecto sinérgico entre ambos, es decir, los prebióticos pueden estimular el crecimiento de cepas específicas probióticas y, por tanto, contribuir a la instalación de una microflora bacteriana específica con efectos beneficiosos para la salud (FAO, 2016).

## **2.6. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA**

La metodología de superficie de respuesta (MSR) fue introducida en el diseño experimental, por primera vez, por Box & Wilson (1951). La MSR es una metodología estadística que modela y analiza problemas, permitiendo solucionarlos al encontrar las condiciones óptimas de las variables independientes que maximizan, minimizan o cumplen restricciones en las variables de respuesta (Gutiérrez & De la Vara Salazar, 2008).

La investigación de una superficie de respuesta aborda la localización de una región en la cual se encuentra la respuesta óptima de cierta variable dependiente, en las siguientes etapas, luego de comprobar experimentalmente, va reduciendo la superficie de respuesta en estudio, en algunos casos hasta obtener la convergencia en un punto óptimo.

Mediante el empleo de la MSR se obtienen modelos matemáticos que son evaluados estadísticamente para adecuarlos a los datos experimentales, en base a pruebas preliminares, para así poder ser graficados como superficies de respuesta y describir como los factores afectan la variable de respuesta, además, que permite observar el efecto combinado de las variables o factores de respuesta (Montgomery M. , 2002).

La MSR ha sido usada para el desarrollo, mejoramiento y optimización de diferentes bioprocesos (Myres & Mongomery, 2009). Antes de aplicar este método, se debe identificar los factores críticos más importantes en un proceso o sistema, seguido por la determinación del rango de los niveles de los factores y para al final, plantear las hipótesis estadísticas (Montgomery M. , 2002).

Posteriormente, se lleva a cabo el diseño experimental y finalmente se hace el estudio de los datos arrojados por la experimentación mediante un análisis de varianza, donde se observa o no, la existencia de diferencias significativas entre las respuestas obtenidas de los tratamientos aplicados y los modelos matemáticos que los representan (Candioiti, De Zan, Cámara, & Goicoechea, 2014).

Los diseños, proporcionan los diversos tratamientos a ejecutar, para generar los datos necesarios que permitan ajustarlos a modelos que describan la o las variables de respuesta, en función de las variables independientes bajo análisis. Algunas propiedades deseables en los diseños experimentales para la MSR son:

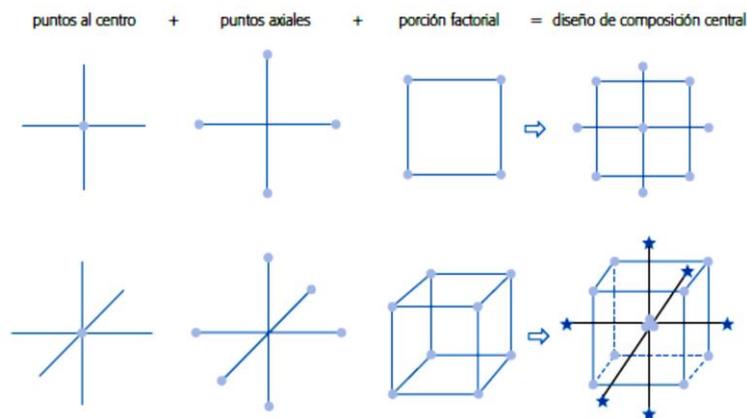
1. Que se genere una distribución satisfactoria de los puntos experimentales sobre toda la región experimental. Los diseños más utilizados son puntos distribuidos de manera uniforme sobre la región experimental, o cuando menos, poseen alguna simetría con respecto al centro de ésta,
2. El diseño debe requerir un número mínimo de corridas experimentales, ya que en cada prueba realizada se gastan recursos que siempre son escasos,
3. El diseño debe permitir que otros diseños de orden mayor se construyan a partir de él. Esto permite que, cuando el comportamiento de la respuesta resulta ser más complicado de lo que se pensaba (se detecta curvatura), se puedan agregar puntos adicionales al diseño para tratar de explicar ese comportamiento,
4. El experimento debe permitir la detección de la falta de ajuste, para lo cual se requieren repeticiones al menos en el centro del diseño,
5. El diseño debe proporcionar un estimado exacto de la varianza del error del modelo, lo cual se logra con repeticiones, al menos, en el punto central.

Dentro de la clasificación de los diseños en la MSR, están los diseños de primer orden que son usados para ajustar modelos en los que solo son importantes los efectos principales y no existen efectos de interacción (Gutiérrez & De la Vara Salazar, 2008). Por su parte, los diseños de segundo orden permiten estudiar efectos lineales, de interacción y efectos cuadráticos o de curvatura pura (Gutiérrez & De la Vara Salazar, 2008).

Uno de los diseños de segundo orden más utilizados en la industria es el Diseño Central Compuesto (DCC) (Gutiérrez & De la Vara Salazar, 2008). Este diseño se emplea en la etapa de búsqueda de un modelos de segundo orden, y se puede construir a partir de un diseño factorial completo ( $2^k$ ) o factorial fraccionario ( $2^{k-p}$ ), agregando puntos sobre los ejes y al centro del diseño, además de otras propiedades deseables como rotabilidad (Candioiti, De Zan, Cámara, & Goicoechea, 2014).

La rotabilidad es una propiedad deseable en un DCC, la cual consiste en que la varianza de los valores estimados sea constante en puntos equidistantes del centro del diseño (Jiménez, 2015). Esta propiedad se logra estableciendo  $\alpha = (2^K)^{1/4}$ . Así, el valor de  $\alpha$  para un diseño con dos factores es igual a 1.4142 y para tres factores  $\alpha = 1.6818$ . La fórmula para  $\alpha$  cambiará, si se realizan réplicas del diseño o si se utiliza un diseño factorial fraccionario (Candioiti, De Zan, Cámara, & Goicoechea, 2014).

El DCC se compone de tres tipos de puntos:



**Figura 4.** Representación y construcción de los DCC para  $k=2$  (superior) y  $k=3$  (inferior) (Gutiérrez & De la Vara Salazar, 2008).

1. Una réplica de un diseño factorial en dos niveles, completo o fraccionado. A partir del DCC se llama porción factorial.
2.  $\eta_0$  puntos o repeticiones al centro del diseño deben ser  $\eta_0 \geq 1$ .

3. Dos puntos sobre cada eje a una distancia  $\alpha$  del origen. Estos puntos se llaman porción axial. La manera en que se ensamblan y el DCC resultante, para los casos de dos y tres factores (Fig. 4).

## **2.7. ANÁLISIS SENSORIAL**

El análisis sensorial se define como el conjunto de técnicas que abarca la identificación, medición, análisis e interpretación de respuestas percibidas por medio de los sentidos (Manfugás, 2007). Las pruebas analíticas y las pruebas a los consumidores son las técnicas de análisis sensorial. Existen dos tipos de técnicas de análisis sensorial que se aplican dependiendo el objetivo que se persiga.

Las pruebas de consumidores se aplican para determinar las preferencias de la persona hacia cierto producto a ser analizado por medio de los sentidos. A su vez, esta prueba se subdivide en pruebas de preferencia en la que los panelistas realizan una elección entre los productos a ser analizados y pruebas hedónicas en la cual el panelista evalúa cierto producto por medio de una escala (González, Rodeiro, Sanmartín, & Vila, 2014).

A la hora de elegir la manera de medir las respuestas, el analista debería seleccionar el método sensorial más simple que pueda medir las diferencias esperadas entre muestras y que minimice el tiempo. La escala es el instrumento que se utiliza para medir las respuestas sensoriales y es una parte fundamental dentro del análisis sensorial (Cordero, 2013).

El instrumento empleado en la evaluación sensorial son jueces, capacitados para hacer una evaluación y medición, a través de la percepción por medio de los sentidos, de características de sabor, olor, color, apariencia, textura. El juez sensorial puede ser comparado con un instrumento debido a las siguientes características: mide objetivamente con los sentidos, usa métodos exactos, recibe entrenamiento, participa en un panel cuyos resultados pueden analizarse estadísticamente (Cordero, 2013).

En un examen sensorial, la evaluación se realiza por medio de tres fases textura, apariencia y olfato-gustativa (Bérodier et al, 1997). Para cada fase de análisis sensorial se usa descriptores, los cuales son evaluados mediante una escala creciente de intensidad asumiendo que dicha característica puede ser evaluada en el producto o alimento a ser evaluado.

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO**

##### **3.1.1. UBICACIÓN**

**Tabla 7.** Ubicación del área de estudios

<b>Provincia</b>	Imbabura
<b>Cantón</b>	Ibarra
<b>Parroquia</b>	Sagrario
<b>Lugar</b>	Laboratorio de análisis físico químicos y microbiológicos – FICAYA – UTN

##### **3.1.2. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO**

El desarrollo del experimento se llevó a cabo en el laboratorio de análisis físico químico y microbiológico de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA) de la Universidad Técnica del Norte (UTN), ubicado en la ciudadela universitaria Av. 17 de Julio 5-21 y Gral. José María Córdova, Ibarra, Imbabura, CP 100105, Ecuador.

##### **3.1.3. CARACTERÍSTICAS CLIMATOLÓGICAS**

**Tabla 8.** Características Climatológicas.

<b>Altitud</b>	2256 m.s.n.m
<b>Temperatura</b>	21 °C
<b>Humedad relativa promedio</b>	73%
<b>Latitud</b>	0°20' Norte

Fuente: (INAMHI, 2017)

## **3.2. MATERIALES Y EQUIPOS**

### **3.2.1. MATERIA PRIMA E INSUMOS**

- Suero de leche en polvo (SLP)
- Cultivo: Gránulos de kéfir
- Fosfato di ácido de potasio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Sulfato de magnesio  $\text{MgSO}_4$
- Glucosa

### **3.2.2. EQUIPOS**

- Zaranda
- Balanza gramera
- Espectrofotómetro UV-visible
- Equipo de refrigeración
- Refractómetro
- Autoclave
- Centrífuga refrigerada

### **3.2.3. MATERIALES**

- Erlenmeyers
- Frascos
- Micropipetas
- Tubos Epperdorff
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcon
- Paletas metálicas
- Probeta

### 3.3. METODOLOGÍA

#### 3.3.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL KEFIRÁN OBTENIDO EN LA FERMENTACIÓN

La validación de la técnica analítica fenol-ácido sulfúrico presentada por (Dubois, Gilles, Rebers, & Smith, 1956) para la determinación de azúcares y sustancias relacionadas; fue usada para la cuantificación del kefirán. Se realizó la validación de la técnica analítica mediante curvas de calibración de diferentes concentraciones de glucosa: 4, 2, 1, 0.5 µg/ml.

Se tomó 1 ml de muestra de cada concentración y rápidamente se añadió 1 ml de fenol y 5 ml de ácido sulfúrico; las muestras se dejaron por 30 min a temperatura ambiente para que ocurra la reacción y a continuación se procedió a realizar lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 485 nm (6705 UV/vis *Spectrophotometer*). Para el blanco se sustituyó la muestra por agua destilada y se añadió la misma cantidad de fenol y ácido sulfúrico.

#### 3.3.2. FACTORES EN ESTUDIO

Los factores en estudio para la bebida funcional se determinaron según pruebas preliminares y están dados por:

**Tabla 9.** Factor A (Temperatura (°C)) y Factor B (Contenido de suero de leche en polvo (SLP) (% m/m)).

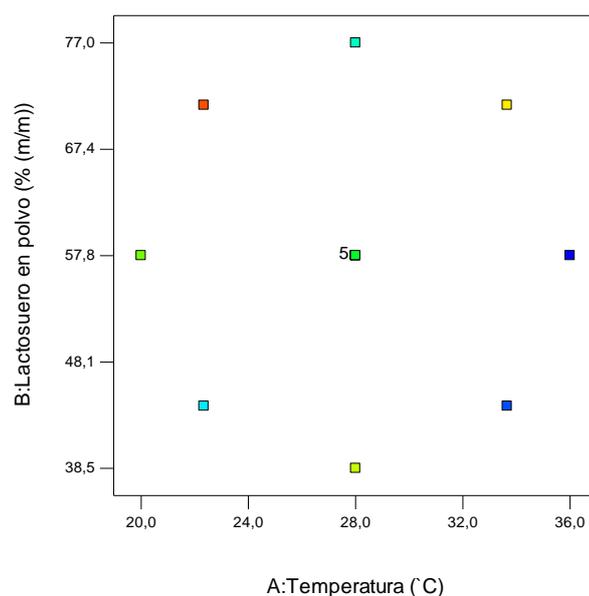
FACTOR A		FACTOR B	
Simbología	Temperatura (°C)	Simbología	Contenido SLP (% m/m)
A1	20.0	B1	38.5 %
A2	22.3	B2	44.1 %
A3	28.0	B3	57.8 %
A4	33.7	B4	71.4 %
A5	36.0	B5	77.0 %

### 3.3.3. TRATAMIENTOS

El diseño experimental en este estudio acogió 13 tratamientos; los cuales, brinda cinco repeticiones al punto central. Las variables se muestran codificadas a razón de -1.414, -1.000, 0.000, +1.000, +1.414 para una mejor comprensión en el análisis estadístico del diseño experimental.

**Tabla 10.** Tratamientos para la bebida funcional.

Trat.	Var. codificadas		Var. reales	
	A: X <sub>1</sub>	B: X <sub>2</sub>	A: Temperatura (°C)	B: SLP (%m/m)
1	-1.414	0.000	20.0	57.8
2	-1.000	-1.000	22.3	44.1
3	-1.000	+1.000	22.3	71.4
4	0.000	-1.414	28.0	38.5
5	0.000	+1.414	28.0	77.0
6	0.000	0.000	28.0	57.8
7	0.000	0.000	28.0	57.8
8	0.000	0.000	28.0	57.8
9	0.000	0.000	28.0	57.8
10	0.000	0.000	28.0	57.8
11	+1.000	-1.000	33.7	44.1
12	+1.000	+1.000	33.7	71.4
13	+1.414	0.000	36.0	57.8



**Figura 5.** Distribución de las variables de estudio en forma gráfica.

### 3.3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

La combinación de temperatura entre valores de 20 - 36°C y el contenido de SLP de 38.5 - 77.0% (m/m) (Tabla 10), fue investigada mediante la búsqueda de la combinación que maximice la concentración de kefirán, población de BAL y levaduras, y la reducción del pH en la bebida funcional.

Trece tratamientos aleatorizados y codificados (Tabla 10) fueron propuestos, para lo cual, se empleó la metodología de superficie de respuesta mediante un diseño compuesto central. Para el análisis estadístico se empleó un paquete estadístico *DESIGN EXPERT 10.0 (Stat-Easy Inc)*.

Las funciones de respuesta estuvieron relacionadas para la maximización mediante una cierta función de deseabilidad  $D$  optimizada mediante la concentración de kefirán, población de BAL y levaduras y la reducción de pH, como:

$$D = [K^{m_1} L^{m_2} Y^{m_3} P^{m_4}]^{(1/(m_1+m_2+m_3+m_4))} \quad [1]$$

Donde;  $K$ ,  $L$ ,  $Y$ ,  $P$  son la concentración de kefirán (mg Glu/ml), BAL (UFC/ml), levaduras (UFC/ml) y la reducción de pH ( $-\Delta\text{pH}$ ), respectivamente, durante un tiempo de fermentación (48 h) igual para todos los tratamientos;  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ ,  $m_4$  son los factores de ponderación para las concentraciones de kefirán, BALs, levaduras y de reducción de pH, respectivamente. Cada uno de estos factores pudieron ajustarse mediante un modelo estadístico cuadrático:

$$F = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{1 \leq i < j}^2 \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad [2]$$

Donde  $F$  es la variable de respuesta transformada o directa de la concentración de kefirán (mg Glu/ml), población de BALs (UFC/ml), población de levaduras (UFC/ml) y caída de pH (-);  $\beta_0$  es la media del efecto general del modelo;  $\beta_1$  representa el efecto del factor  $X_1$  (temperatura);  $\beta_2$  representa el efecto del factor  $X_2$  (contenido de lactosuero);  $\beta_{12}$  es el efecto de la interacción entre los factores  $X_1$  y  $X_2$ ;  $\beta_{11}$  representa el efecto cuadrático de la temperatura ( $X_1$ );  $\beta_{22}$  representa el efecto cuadrático del % de lactosuero ( $X_2$ ), y  $\varepsilon$  es un componente del error aleatorio del modelo que es provocado por otras fuentes de variabilidad que no son contables en el modelo.

Los valores predichos por los modelos para las concentraciones máximas de kefirán, BAL, levaduras, reducción de pH y la función de deseabilidad máxima se validaron ejecutando experimentos adicionales en las mismas condiciones óptimas para la temperatura y el contenido de SLP predichas.

### **3.3.5. UNIDAD EXPERIMENTAL**

Cada unidad experimental estuvo constituida por 100 g del medio de cultivo y del cual se obtendrá la bebida funcional.

## **3.4. VARIABLES A EVALUAR**

### **3.4.1. VARIABLES CUANTITATIVAS**

La concentración de kefirán, población de BALs y levaduras, así como, la caída de pH, fueron evaluadas a todos los tratamientos con el fin de encontrar un modelo que pueda ser empleado para optimizar (maximizar) estas respuestas en la bebida funcional. El ácido láctico, la viscosidad, el contenido de alcohol etílico, proteína y grasa, también fueron evaluados a las condiciones óptimas de cierta función de deseabilidad en la bebida funcional.

Las técnicas analíticas fueron realizadas mediante las metodologías descritas a continuación:

#### **3.4.1.1. Concentración de kefirán**

Para la determinación del kefirán se usó 5 ml de lactosuero fermentado y 5 ml de alcohol absoluto a -20°C. Para la precipitación se usó una centrifuga refrigerada (Sorvall ST 16 *Centrifuge*) durante 30 min a 4°C y 1690xg. El precipitado se lavó dos veces con agua destilada para eliminar otros materiales insolubles. En ambos casos, la mezcla redisuelta se centrifugó a las mismas condiciones anteriores.

Los sobrenadantes de las dos centrifugaciones fueron mezclados, se extrajo 1 ml de la mezcla y se cuantificó mediante la técnica analítica del fenol-ácido sulfúrico (Dubois, Gilles, Rebers, & Smith, 1956).

En las muestras, se determinó la absorbancia a una longitud de ondas de 485 nm usando un espectrofotómetro UV/Visible (6705 UV/vis *Spectrophotometer*). La concentración fue calculada mediante el empleo de una curva de calibración,

previamente obtenida por la misma metodología para la glucosa. Los resultados fueron expresados en Abs (@ 485 nm) vs  $\mu\text{g}$  Glu/ml de muestra.

#### **3.4.1.2. Cuantificación de bacterias ácido lácticas y levaduras**

La población de bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras se determinó mediante conteo en placa. Se usó 1 ml de cada muestra y se llevó a diluciones de  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  en el medio de cultivo *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS), para BALs y diluciones de  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en el medio *Yeast Potato Dextrosa* (YPD), para levaduras. Todas las placas fueron incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  por 48 h y los resultados fueron expresados en (UFC/ml).

#### **3.4.1.3. pH**

La medición de pH se realizó a la mezcla antes de la inoculación del gránulo de kéfir y al terminar las 48 h de fermentación mediante el uso de un pH-metro (3510 pHmeter).

#### **3.4.1.4. Determinación de ácido láctico**

Se realizó mediante la técnica analítica AOAC 947-05, destinada para la cuantificación de acidez titulable (% (m/m) ácido láctico) en leche, el método fue realizado por *MULTIANALITYCA* Cia. Ltda. (Cap. Edmundo Chiriboga N47-154 y Jorge Aníbal Páez, Quito, Pichincha, Ecuador).

#### **3.4.1.5. Determinación de grado alcohólico**

El grado alcohólico de la bebida ( $^{\circ}\text{GL}$ ) fue determinado mediante cromatografía de gases. El método fue realizado en los laboratorios de *MULTIANALITYCA* Cia. Ltda.

#### **3.4.1.6. Determinación de viscosidad**

La viscosidad de la bebida fue determinada mediante la técnica analítica AOAC 991-36, sus resultados fueron expresados en centipoise ( $1 \text{ cP} = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ). El método fue realizado por *MULTIANALITYCA* Cia. Ltda.

#### **3.4.1.7. Determinación de proteína**

El contenido de proteína en la bebida funcional se realizó mediante lo estipulado en la norma INEN 465

#### **3.4.1.8. Determinación de grasa**

El contenido de grasa en la bebida funcional fue determinado mediante lo estipulado en la norma INEN 165

### **3.4.2. VARIABLES CUALITATIVAS**

Se realizó un análisis sensorial de la bebida fermentada elaborada utilizando los parámetros óptimos, empleando una ficha de cata (Anexo 1), la cual fue elaborada mediante el uso de descriptores (Bérodier et al, 1997), donde se propuso una escala de intervalo estructurada y numérica cuyo valor mínimo es el 0 (ausente) y el 7 (más intenso).

Para la muestra óptima, los catadores analizaron 19 parámetros sensoriales clasificados en tres fases: apariencia, olfativa y gustativa. La puntuación máxima que puede alcanzar la bebida es de 7 puntos. Para la realización de las pruebas sensoriales se contó con un grupo de 10 catadores semi-entrenados.

A los catadores semi entrenados se les entregó las referencias de olores, aromas y sabores elementales (salado, ácido, amargo y dulce) (Anexo 2) con el fin de que se familiaricen con estas referencias. Una vez terminado el proceso de evaluación se procedió a tabular los datos y realizar el análisis correspondiente.

### 3.5. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

#### 3.5.1. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE LOS TRATAMIENTOS

Las formulaciones de cada tratamiento se realizaron acorde a las concentraciones del contenido de suero de leche en polvo (SLP) sugeridos por el diseño central compuesto experimental, considerando que la bebida para fermentar tuvo, en todos los tratamientos, 14° Brix, cómo se sugiere en otros reportes (Sabokbar, Moosavi-Nasab, & Khodaiyan, 2015) a pH 6.8.

Se elaboraron soluciones madres de lactosuero reconstituido al 12% (m/v), glucosa al 77% (m/v). Además, se consideró una solución de sales a 10X para lo cual se añadió  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 1% (m/v),  $\text{MgSO}_4$  al 5% (m/v) y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 1% (m/v) como se recomienda por otros autores (Kilic, Demirhan, Ozel, & Ozbek, 2015)

Para lograr que todos los experimentos empiecen con la misma cantidad de ° Brix, se realizó una medición de °Brix a cada solución madre, obteniendo los datos mostrados en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Grados Brix de las soluciones madres.

<b>Grados Brix de soluciones madres</b>		
	<b>Soluciones madres</b>	<b>°Brix</b>
m <sub>1</sub>	SLP reconstituido	12.0%
m <sub>2</sub>	Sol. Sales 10X	5.5%
m <sub>3</sub>	Glucosa al 77% (m/v)	39.0%
m <sub>4</sub>	Agua Destilado	0.0%

Después de conocer los °Brix de cada solución se procedió a realizar las formulaciones demostrando que los °Brix de una mezcla es equivalente a la sumatoria ponderada de los °Brix de cada solución, como se muestra en la Ec. [3].

Para cada mezcla se consideró como variantes al SLP entre valores de 38.5% a 77% (m/m), la solución de sales como un valor estable y la glucosa y agua como valores dependientes de las anteriores soluciones; considerando que la unidad experimental fue de 100 g (Tabla 12).

$$^{\circ}\text{Brix}_M = \frac{(m_1 \cdot ^{\circ}\text{Brix}_1) + (m_2 \cdot ^{\circ}\text{Brix}_2) + (m_3 \cdot ^{\circ}\text{Brix}_3) + (m_4 \cdot ^{\circ}\text{Brix}_4)}{m_1 + m_2 + m_3 + m_4} \quad [3]$$

**Tabla 12.** Formulaciones correspondientes al factor B.

		FACTOR B <sub>1</sub>			FACTOR B <sub>2</sub>		
		%(m/m)	masa (g)	%Brix	%(m/m)	masa (g)	%Brix
SLP	m <sub>1</sub>	38.5	39.9	4.8%	44.2	45.8	5.5%
Solución de Sales	m <sub>2</sub>	9.6	10.0	0.6%	9.6	10.0	0.6%
Glucosa 77%	m <sub>3</sub>	21.4	22.2	8.0%	19.6	20.4	7.9%
H <sub>2</sub> O	m <sub>4</sub>	26.9	27.9	0.0%	23.0	23.9	0.0%
			<b>100.0</b>	<b>14.0%</b>		<b>100.0</b>	<b>14.0%</b>
Inóculo	m <sub>5</sub>	3.6	3.7		3.6	3.7	
<b>Total</b>		<b>100.0</b>	<b>103.7</b>		<b>100.0</b>	<b>103.7</b>	

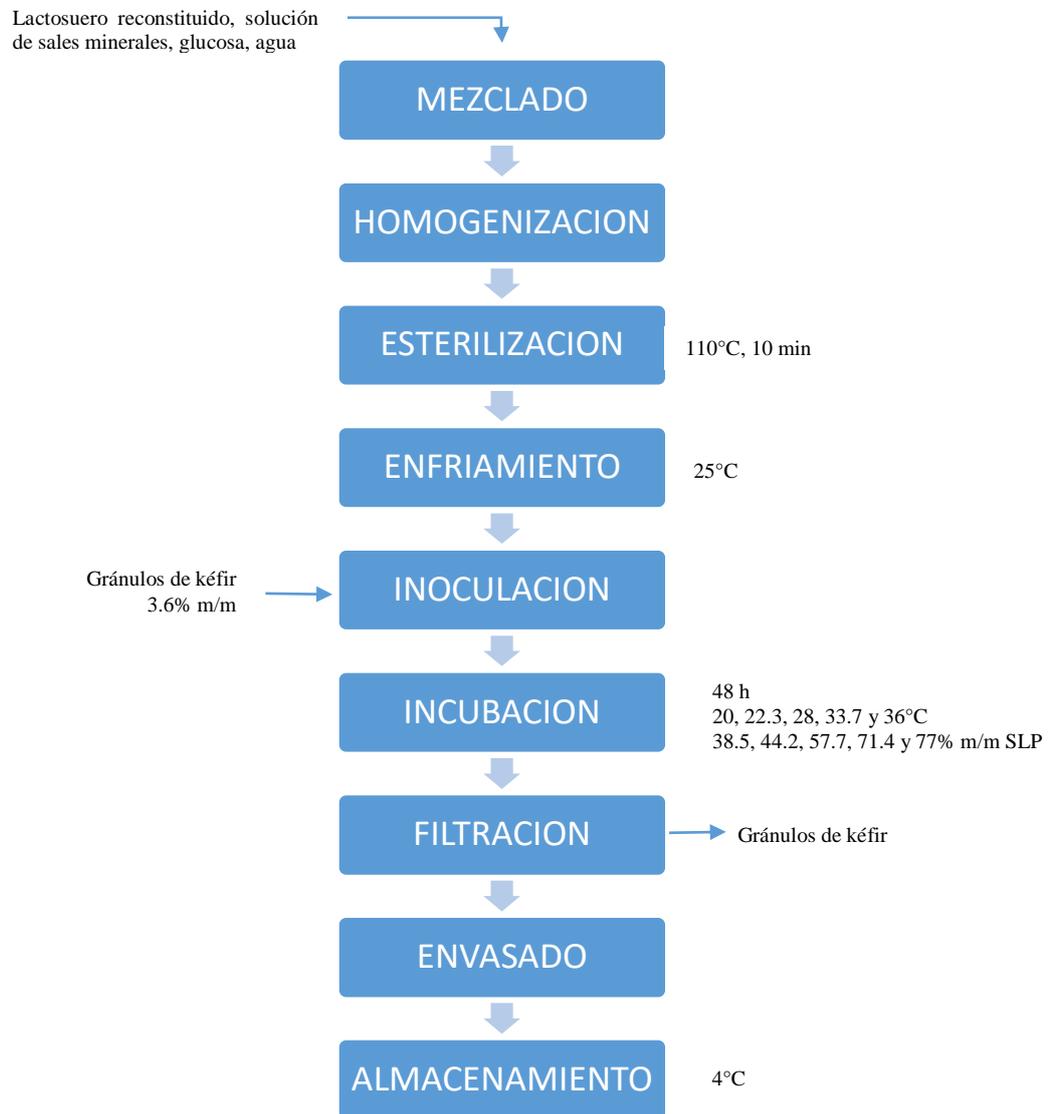
		FACTOR B <sub>3</sub>			FACTOR B <sub>4</sub>		
		%(m/m)	masa (g)	%Brix	%(m/m)	masa (g)	%Brix
SLP	m <sub>1</sub>	57.7	59.9	7.2%	71.4	74.0	8.9%
Solución de Sales	m <sub>2</sub>	9.6	10.0	0.6%	9.6	10.0	0.6%
Glucosa 77%	m <sub>3</sub>	15.4	16.0	6.2%	11.2	11.7	4.5%
H <sub>2</sub> O	m <sub>4</sub>	13.6	14.2	0.0%	4.2	4.3	0.0%
			<b>100.0</b>	<b>14.0%</b>		<b>100.0</b>	<b>14.0%</b>
Inóculo	m <sub>5</sub>	3.6	3.7		3.6	3.7	
<b>Total</b>		<b>100.0</b>	<b>103.7</b>		<b>100.0</b>	<b>103.7</b>	

		FACTOR B <sub>5</sub>		
		%(m/m)	masa (g)	%Brix
SLP	m <sub>1</sub>	77.0	80.0	9.6%
Solución de Sales	m <sub>2</sub>	9.6	10.0	0.6%
Glucosa 77%	m <sub>3</sub>	9.6	10.0	3.9%
H <sub>2</sub> O	m <sub>4</sub>	0.1	0.0	0.0%
			<b>100.0</b>	<b>14.0%</b>
Inóculo	m <sub>5</sub>	3.6	3.7	
<b>Total</b>		<b>100.0</b>	<b>103.7</b>	

### 3.5.2. DIAGRAMAS DE BLOQUES Y DESCRIPCIÓN DE PROCESOS

#### 3.5.2.1. Diagrama de bloques para la obtención de la bebida funcional



### **3.5.2.2. Descripción del proceso de la bebida funcional**

#### **Mezclado**

Se preparó los tratamientos de acuerdo con los componentes de cada experimento (Tabla 12).

#### **Homogenización**

Los 100 g de cada mezcla fue homogenizada hasta obtener una bebida homogénea y lista para el siguiente proceso.

#### **Esterilización**

Las mezclas fueron llevadas a esterilización a 110°C por 10 min, después enfriadas hasta temperatura ambiente.

#### **Inoculación**

La inoculación se realizó mediante flujo laminar. Usando azas metálicas se tomó 3.6% (m/m) del gránulo de kéfir y fue inoculado en el Elenmeyer de la bebida.

#### **Incubación**

Mediante el uso de un agitador oscilante (*MPC WBT-200*), las mezclas fueron incubadas por 48 h, a 100 rpm y temperaturas entre 20 - 36°C acorde al diseño compuesto central propuesto.

#### **Filtración**

Con el fin de retirar los gránulos de kéfir de la bebida se realizó la filtración. Para este proceso se usó un cernidor.

#### **Envasado**

Las bebidas fueron envasadas y almacenadas para ser usadas al momento de realizar las técnicas analíticas.

### **3.6. EXTRACCIÓN DEL KEFIRÁN**

Una vez realizado la corroboración de las condiciones óptimas para obtener kefirán mediante la repetición del proceso, se procedió a la extracción del kefirán. El proceso fue adaptado a la técnica analítica realizada por (Rimada & Abraham, 2001). La metodología consistió colocar 100 ml de alcohol absoluto en 100 ml del lactosuero fermentado por 48 h a 4 °C. Una vez cumplido el tiempo, la muestra fue llevada a centrifugación por 3000xg por una hora a 4 °C. El sobrenadante de la centrifugación fue retirado y remplazado por 10 ml de agua caliente seguidamente el pellet fue re-suspendido en un vibrador (*Vortex Mixer #500*), se volvió a centrifugar a 4000xg por 50 min a 20°C. El proceso de centrifugación fue realizado por 3 veces con el fin de obtener un precipitado blanco (*pellet*) limpio. El volumen obtenido de la última centrifugación realizada fue pesado y llevado a secado en un secador (*single display 500*) a 75°C, hasta verificar que en la materia seca ya no exista una diferencia de peso, se procedió a pesar el producto final y sus resultados fueron expresados en g/l.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUCIONES

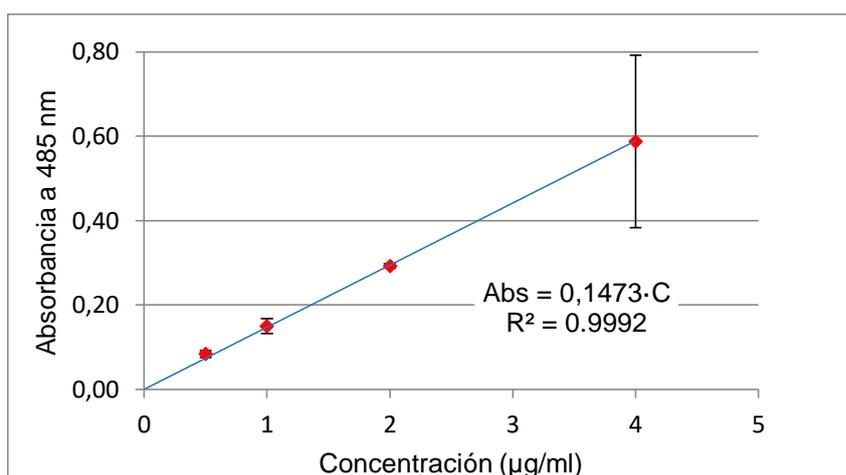
#### 4.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL KEFIRÁN

La cuantificación del kefirán se realizó mediante espectrofotometría y de acuerdo con la ley de Lambert-Beer (Rodríguez, Garrido, Martinez, & García, 2011). Para la determinación de la concentración de glucosa se construyó una curva de referencia con diferentes concentraciones de glucosa (Tabla 13) cuya absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 485 nm, la cual fue empleada para la cuantificación del kefirán según el método de Dubois et al. (Dubois, Gilles, Rebers, & Smith, 1956).

**Tabla 13.** Concentraciones de glucosa ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Concentración $\mu\text{g/ml}$	R1 Abs	R2 Abs	R3 Abs	Promedio Abs
4.0	0.824	0.475	0.465	$0.588 \pm 0.204$
2.0	0.289	0.291	0.299	$0.293 \pm 0.005$
1.0	0.155	0.138	0.157	$0.150 \pm 0.010$
0.5	0.075	0.087	0.091	$0.084 \pm 0.008$

La curva patrón (Fig. 6) muestra una relación lineal con la concentración de glucosa ( $\mu\text{m Glu/ml}$ ) y la absorbancia dentro del rango de exploración. Se obtuvo un coeficiente de regresión  $R^2 = 0.992$ , el cual indica que la curva realizada tiene un ajuste cuadrático bueno, mediante la ecuación  $\text{Abs}_{@485 \text{ nm}} = 0.1473 \cdot C$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenida mediante los datos. Esta ecuación, fue usada para determinar la concentración de kefirán.



**Figura 6.** Curva de calibración de glucosa usada posteriormente para la cuantificación del kefirán.

En la Fig. 6, se pudo observar que mantiene una linealidad hasta la concentración de 4 µg/ml de glucosa. Analizando los datos obtenidos se pudo observar que tiene un comportamiento similar a las curvas reportadas por otros autores (Dubois, Gilles, Rebers, & Smith, 1956), debido a que se visualiza una curva de absorbancia característica de azúcares.

Mediante este análisis se pudo corroborar, que la curva patrón de glucosa y la ecuación se pudo usar para determinar la concentración de kefirán en las muestras de lactosuero fermentado.

#### **4.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTIMOS DEL BIOPROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE KEFIRÁN, BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y pH EN LA BEBIDA FUNCIONAL**

Los valores reales de cada respuesta dependiente se ajustaron a modelos cuadráticos. Para la concentración de kefirán y reducción de pH se usó un modelo de regresión de segundo orden, mientras que para la población de BAL y levaduras se usó modelo cuadrático, en los cuales, la variable de respuesta fue transformada a logaritmo natural, con el fin de mantener la ortogonalidad de los modelos.

Los modelos de segundo orden usados para estimar la concentración de kefirán, población de BAL, levaduras y la reducción de pH durante la fermentación fueron:

- Modelos de las variables de respuesta en factores codificados

$$K = 184.520 - 15.529 \cdot X_1 - 10.215 \cdot X_2 + 4.550 \cdot X_1X_2 - 19.235 \cdot X_1^2 + 12.065 \cdot X_2^2 \quad [4]$$

$$P = 3.038 + 0.109 \cdot X_1 - 0.019 \cdot X_2 - 0.017 \cdot X_1X_2 - 0.076 \cdot X_1^2 - 0.058 \cdot X_2^2 \quad [5]$$

$$\ln L = 19.578 + 1.009 \cdot X_1 + 0.323 \cdot X_2 - 0.512 \cdot X_1X_2 - 0.784 \cdot X_1^2 \quad [6]$$

$$\ln Y = 19.234 + 0.358 \cdot X_1 - 0.004 \cdot X_2 - 0.868 \cdot X_1^2 + 0.520 \cdot X_2^2 \quad [7]$$

- Modelos de las variables de respuesta en términos reales:

$$K = 146.18437 + 27.503596 \cdot Temp - 9.9260183 \cdot SLP + 0.0590909 \cdot Temp \cdot SLP - 0.6010938 \cdot Temp^2 + 0.0651172 \cdot SLP^2 \quad [8]$$

$$P = -0.676125 + 0.1641105 \cdot Temp + 0.0411589 \cdot SLP - 0.000221 \cdot Temp \cdot SLP - 0.00236 \cdot Temp^2 - 0.00315 \cdot SLP^2 \quad [9]$$

$$\ln L = -16.7565293 + 1.93484088 \cdot Temp + 0.21003614 \cdot SLP - 0.0066542 \cdot Temp \cdot SLP - 0.02450377 \cdot Temp^2 \quad [10]$$

$$\ln Y = 5.5708937 + 1.5827842 \cdot Temp - 0.324663 \cdot SLP - 0.027133 \cdot Temp^2 + 0.0028086 \cdot SLP^2 \quad [11]$$

Donde:

*K*: Concentración de kefirán, (mg Glu/ml)

*P*: Reducción de pH, (-)

*L*: Población de BAL, (UFC/ml)

*Y*: Población de levaduras, (UFC/ml)

*X<sub>1</sub>*: Variable codificada de la temperatura

*X<sub>2</sub>*: Variable codificada del contenido de lactosuero en polvo

*Temp.*: variable real de la temperatura, (°C)

*SLP*: Contenido de suero de leche en polvo (% (m/m))

Las ecuaciones en términos reales se utilizaron para hacer predicciones sobre la respuesta para niveles dados de cada factor. Mientras que, las ecuaciones codificadas fueron útiles para identificar el impacto relativo de los factores al comparar los coeficientes del factor (Gutiérrez & De la Vara Salazar, 2008).

**Tabla 14.** Resultados del Diseño Central Compuesto de variables independientes de respuesta ( $X_1$ : Temperatura y  $X_2$ : % de SLP) junto con las respuestas predichas y reales de las variables dependientes.

Corr.	$X_1$	$X_2$	Kefirán (K) (mg Glu/ml)		BAL(L) $\times 10^8$ (UFC/ml)		Levaduras (Y) $\times 10^8$ (UFC/ml)		-ΔpH (P) (-)	
			Predicho	Real	Predicho	Real	Predicho	Real	Predicho	Real
1	-1.41	0.00	168.01	188.15	0.16	0.13	0.24	0.19	2.7	2.6
2	-1.00	-1.00	207.64	190.45	0.23	0.23	1.12	1.30	2.8	2.9
3	-1.00	1.00	178.11	159.30	1.22	2.00	1.11	1.39	2.8	2.8
4	0.00	0.00	184.52	208.20	3.18	3.00	2.26	2.50	3.0	3.1
5	0.00	1.41	194.20	208.20	5.02	3.36	6.35	5.72	2.9	2.9
6	0.00	0.00	184.52	162.00	3.18	2.35	2.26	2.30	3.0	3.0
7	0.00	0.00	184.52	175.00	3.18	3.20	2.26	2.20	3.0	3.0
8	0.00	0.00	184.52	187.40	3.18	2.42	2.26	1.42	3.0	3.0
9	0.00	-1.41	223.10	234.80	2.01	2.71	6.42	6.46	2.9	2.9
10	0.00	0.00	184.52	190.00	3.18	3.25	2.26	3.25	3.0	3.0
11	1.00	-1.00	167.49	160.60	4.81	6.00	2.29	2.00	3.0	3.1
12	1.00	1.00	156.16	147.65	3.29	6.72	2.27	2.16	3.0	3.0
13	1.41	0.00	124.09	129.65	2.76	1.66	0.66	0.77	3.0	3.1

En la Tabla 14, se muestra las variables independientes codificadas junto con los valores del modelo predicho y los valores reales obtenidos mediante la experimentación.

#### 4.2.1. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DEL BIOPROCESO

El análisis de varianza (ANOVA) para los modelos sugeridos obtenidos mediante la experimentación y análisis estadístico de cada variable se muestran en la Tabla 15. El análisis de varianza de las variables de respuesta permitió diagnosticar si los modelos sugeridos estadísticamente sirven para encontrar niveles óptimos (mayor concentración) de producción de probióticos y prebióticos en la bebida funcional. Lo cual se realizó mediante la optimización (maximización) de dichas variables utilizando la función de deseabilidad.

El ANOVA de los modelos estimados para la concentración de kefirán, población de BAL, población de levaduras y diferencia de pH, muestra que el valor-p de los modelos utilizados para cada variable de respuesta es significativo debido a que muestran un valor-p < 0.05. Demostrando que estos modelos pueden ser utilizados para encontrar la optimización de los parámetros óptimos del bioproceso (Gutiérrez & De la Vara Salazar, 2008).

**Tabla 15.** ANOVA para los modelos de segundo orden de la concentración de kefirán (K), población de BAL (L) y levaduras (Y), y reducción de pH (P) durante la fermentación.

Fuente	gl	Kefirán (K) (mg Glu/ml)				-ΔpH (P) (-)			
		Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-p Prob>F	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-p Prob>F
Modelo	4/5	6840.85	1710.21	4.85	0.0278	0.15	0.03	6.195	0.017
X <sub>1</sub> -Temp	1	1929.18	1929.18	5.48	0.0474	0.09	0.09	18.889	0.003
X <sub>2</sub> -%SLP	1	834.73	834.73	2.37	0.1623	0.00	0.00	0.592	0.467
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1					0.00	0.00	0.232	0.645
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	2573.81	2573.81	7.31	0.0270	0.04	0.04	7.930	0.026
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	1012.62	1012.62	2.87	0.1284	0.02	0.02	4.738	0.066
Residual	7	2818.39	352.30			0.04	0.01		
Falta de Aj.	3	1621.55	405.39	1.35	0.3878	0.02	0.01	2.733	0.178
Error Puro	4	1196.85	299.21			0.01	0.00		
Correl Total	12	9659.25				0.19			
R <sup>2</sup>		0.7082				0.8157			
R <sup>2</sup> Ajustado		0.5623				0.6840			
C.V. %		10.42				2.39			
Prec. Adec		8.505				6.572			

Fuente	gl	BAL (L) (UFC/ml)				Levaduras (Y) (UFC/ml)			
		Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-p Prob>F	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor-p Prob>F
Modelo	4	14.38	3.59	18.897	0.0004	9.11	2.28	33.062	5.05·10 <sup>-5</sup>
X <sub>1</sub> -Temp	1	8.14	8.14	42.808	0.0002	1.03	1.03	14.905	4.80·10 <sup>-3</sup>
X <sub>2</sub> -%WPC	1	0.83	0.83	4.384	0.0696	0.00	0.00	0.002	0.969
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	1.05	1.05	5.520	0.0467	-	-	-	-
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	4.35	4.35	22.875	0.0014	5.24	5.24	76.109	2.33·10 <sup>-5</sup>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	1.88	1.88	27.338	7.94·10 <sup>-4</sup>
Residual	8	1.52	0.19			0.55	0.07		
Falta de Aj.	4	1.43	0.36	14.756	0.012	0.19	0.05	0.535	0.720
Error Puro	4	0.10	0.02			0.36	0.09		
Correl Total	12	15.90	3.59			9.66			
R <sup>2</sup>		0.9043				0.9430			
R <sup>2</sup> Ajustado		0.8564				0.9144			
C.V. %		2.28				1.38			
Prec.Adec.		12.761				20.205			

Al analizar los términos del modelo de la concentración de kefirán (Ec. [4]) mostrados en la Tabla 15, muestra que el término del efecto lineal de la temperatura (X<sub>1</sub>) y el término del efecto cuadrático de la temperatura (X<sub>1</sub><sup>2</sup>) fueron significativos. Mientras que el efecto lineal del contenido de SLP (X<sub>2</sub>) y el efecto cuadrático del contenido de SLP (X<sub>2</sub><sup>2</sup>) muestran un valor-p por encima del intervalo de confianza usado, por lo cual no muestran significancia.

En el análisis de los términos del modelo cuadrático de la reducción de pH (Ec. [5]), muestra que el efecto lineal de la temperatura (X<sub>1</sub>) y el efecto cuadrático de la temperatura (X<sub>1</sub><sup>2</sup>) son términos significativos. Mientras que, el efecto lineal del contenido de SLP (X<sub>2</sub>), la interacción de la temperatura con el contenido de SLP (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>) y el efecto cuadrático del contenido de SLP (X<sub>2</sub><sup>2</sup>) no son términos significativos.

Mediante el análisis de los términos del modelo de la población de BAL (Ec. [6]), muestra que el efecto lineal de la temperatura ( $X_1$ ), la interacción de la temperatura con el contenido de SLP ( $X_1X_2$ ) y el efecto cuadrático de la temperatura ( $X_1^2$ ) son términos significativos para el modelo. Y el efecto lineal del SLP ( $X_2$ ) es un término no significativo para este modelo empleado.

Los términos para el modelo de la población de levaduras (Ec. [7]) muestra que el efecto lineal de la temperatura ( $X_1$ ), el efecto cuadrático de la temperatura ( $X_1^2$ ) y el efecto cuadrático del contenido de SLP ( $X_2^2$ ) son términos significativos para la validez del modelo empleado. Mientras que el efecto lineal del contenido de SLP ( $X_2$ ) es un término no significativo.

El ANOVA de los modelos de las variables de respuesta (Tabla 15) muestra que en todos los modelos sugeridos el efecto lineal del contenido de SLP no es un factor significativo. Sin embargo, muestra significancia en los efectos combinados con la temperatura de fermentación. Por lo cual, en este estudio se considera que el contenido de lactosuero no es un factor que demuestra significancia en el proceso de fermentación. En el caso de la temperatura de fermentación en todos los modelos predichos se consideró como un factor significativo en efectos lineales, efectos cuadráticos y los efectos generados por la interacción de los factores.

A demás, en referencia al coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.7082, 0.8157, 0.9043, 0.9430 respectivamente para cada variable, muestran que los modelos usados para la optimización de los parámetros son satisfactorios. Por lo que mediante Gutiérrez y de la Vara Salazar (2008), se puede tomar en cuenta estos modelos cuadráticos debido a que para fines de predicción un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) debe ser por lo menos 0.7.

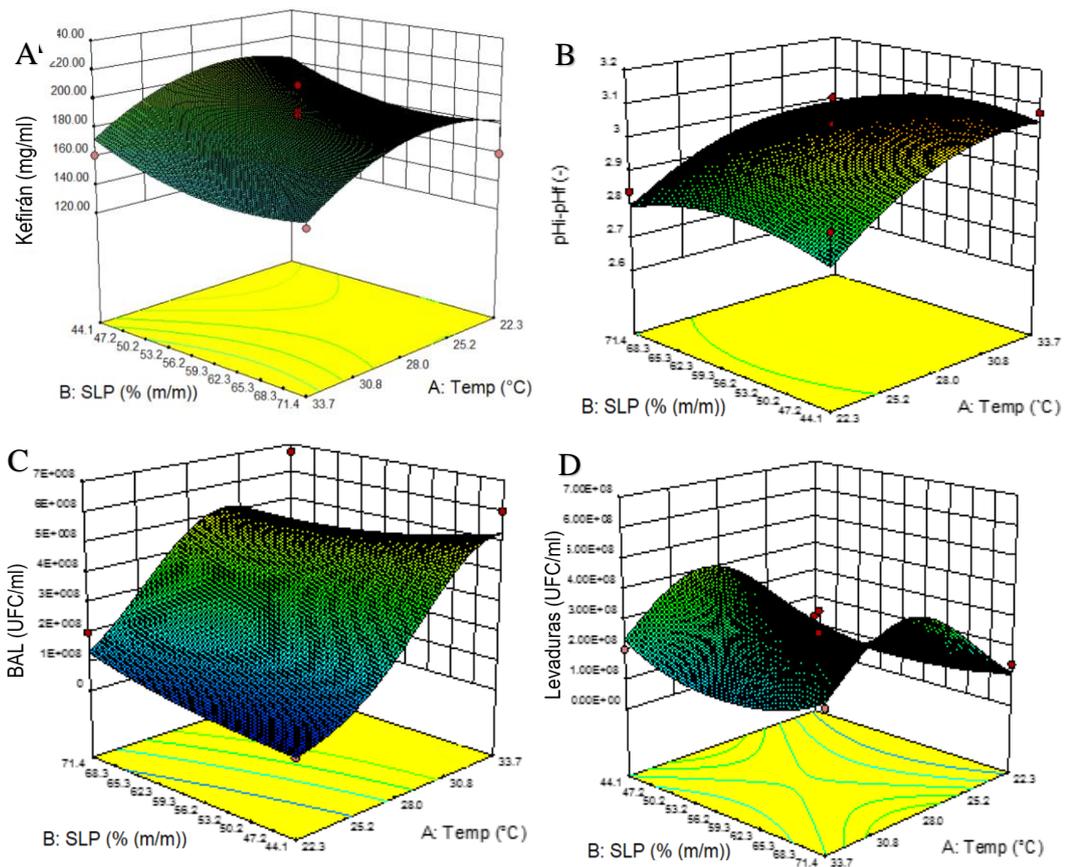
Mediante la prueba de falta de ajuste presentada en la Tabla 15, se muestra que los modelos usados para la concentración de kefirán, población de levaduras y la reducción de pH tienen un valor-p de 0.387, 0.178, 0.720, respectivamente. Dichos modelos no tienen significancia estadística ( $p < 0.05$ ), por lo cual, se confirma que las capacidades predictivas de los modelos usados para estas variables de respuesta son adecuadas y se pueden usar para buscar en su superficie, valores extremos

(máximos o mínimos). Las pruebas de falta de ajuste para estas variables resultaron satisfactorias, por lo que, debido al mejoramiento de los diseños al aplicar puntos axiales permiten estimar las respuestas del modelo con igual precisión en los valores evaluados, manteniendo la condición de rotabilidad de los factores en estudio (Montgomery D. , 2004).

Sin embargo, en relación con el modelo ajustado para la población de BAL; la prueba de falta de ajuste con un valor-p = 0.012, muestra que la falta de ajuste es significativa al error. La prueba de falta de ajuste aplicada a esta variable no corrobora en las demás pruebas que muestran que este modelo es el adecuado para la optimización de las variables. Sin embargo, no se puede descartar que el modelo usado en este caso no es adecuado debido a que siempre existirán circunstancias en las que no todos los criterios se cumplen satisfactoriamente, pero en la práctica no necesariamente es invalidado el modelo (Montgomery D. , 2004).

#### **4.2.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA EN TRES DIMENSIONES DE LAS VARIABLES DE RESPUESTA**

Las gráficas en 3D de los modelos usados para cada variable respectivamente, muestran que mediante el efecto combinado de la temperatura y el contenido de SLP contienen curvaturas en las cuales se puede explorar para encontrar los parámetros óptimos de dichos factores (Fig. 7).



**Figura 7.** Gráficos en 3D de la superficie de respuesta que muestran el efecto combinado de la temperatura (°C) y la cantidad de SLP (% m/m) en la concentración de (A) Kefirán (mg Glu/ml); (B) Reducción de pH; (C) Población de BAL (UFC/ml); (D) Población de levaduras (UFC/ml).

La Fig. 7A muestra el comportamiento de la producción del kefirán en relación con los factores en estudio. Se observa que existe una máxima producción de este prebiótico en rangos estimados de temperatura de 23.0 a 27.0°C y el contenido de SLP se encuentra alrededor de 44.1 % (m/m).

Entonces, para la exploración de la máxima concentración de kefirán se considera que se encuentra dentro de los rangos anteriormente descritos, en los cuales, la concentración de kefirán se estima en valores próximos a 180 mg Glu/ml. Estos parámetros de fermentación muestran semejanza a los obtenidos por otros autores (Sabokbar, Moosavi-Nasab, & Khodaiyan, 2015), donde obtuvieron la mayor concentración de kefirán en una bebida fermentada de lactosuero a una temperatura de 24.32°C.

En la Fig. 7B, se observa valores máximos de  $-\Delta\text{pH}$  de 2.7 a 3.0, para valores de temperatura entre 28.6 a 29.4°C y contenido de lactosuero de 44.1% (m/m). Este declive de pH obtenido después de las 48 h de fermentación es similar a otros resultados reportados, donde se alcanza un pH final de 3.43, empleando 4% de inóculo (Arévalo & Arias, 2008).

Para la máxima población de BAL (Fig. 7C) los valores máximos de temperatura son de 30.7 – 31.8°C y contenido de SLP de 44.1% (m/m), y temperaturas de 28.9-29.2°C en una concentración de 71.4% (m/m) de SLP. Probablemente, los parámetros de temperatura obtenidos se deben a que en los gránulos de kéfir existen variados géneros de BAL, que se denominan mesófilas y termófilas por lo cual fácilmente pueden reproducirse a temperaturas que van de 20 hasta 45°C (Parra, 2010).

Referente a la población de levaduras se observan, que encuentran su mayor concentración a temperaturas de 30.3-30.7°C en una concentración de SLP de 44.1% (m/m) y temperaturas de 28.6-29.1°C en una concentración de 71.4% (m/m) de SLP (Fig. 7D).

En las figuras 7C y 7D, los rangos de temperatura y concentración de SLP son similares para encontrar la maximización de BAL y levaduras. A su vez, estos rangos de optimización se relacionan con los valores óptimos de concentración de kefirán. Debido a que la mayor concentración del kefirán está directamente ligado al proceso fermentativo y por ende, depende de los parámetros en los cuales los microorganismos se desarrollan (Erickson, Fayet, Kakumanu, & Lawrence, 2004).

**Tabla 16.** Coeficientes de regresión, intervalos de confianza ( $p < 0.05$ ) y el error estándar de cada modelo de regresión.

Factor	Kefirán (K) (mg Glu/ml)				-ApH (P) (-)			
	Coefficiente Estimado	% Error Estándar	95% IC Bajo	95% IC Alto	Coefficiente Estimado	% Error Estándar	95% IC Bajo	95% IC Alto
Intercepto	184.52	8.39	165.16	203.88	3.038	0.032	2.963	3.113
$X_1$ -Temp	-15.53	6.64	-30.83	-0.23	0.109	0.025	0.050	0.168
$X_2$ -%SLP	-10.21	6.64	-25.52	5.09	-0.019	0.025	-0.078	0.040
$X_1X_2$	-	-	-	-	-0.017	0.035	-0.101	0.067
$X_1^2$	-19.24	7.12	-35.65	-2.82	-0.076	0.027	-0.139	-0.012
$X_2^2$	12.07	7.12	-4.35	28.48	-0.058	0.027	-0.122	0.005

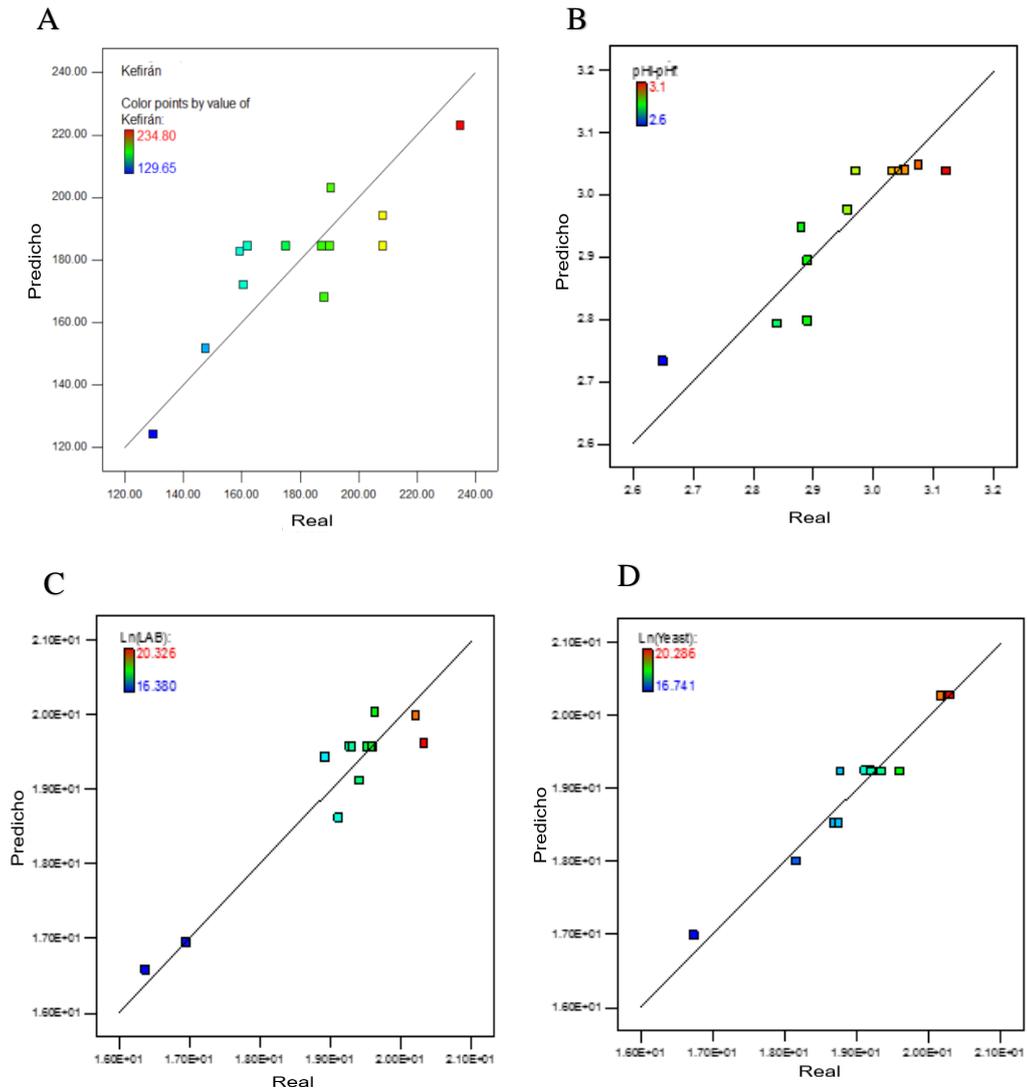
  

Factor	BAL (L) (UFC/ml)				Levaduras (Y) (UFC/ml)			
	Coefficiente Estimado	% Error Estándar	95% IC Bajo	95% IC Alto	Coefficiente Estimado	% Erros Estándar	95% IC Bajo	95% IC Alto
Intercepto	19.578	0.158	19.215	19.941	19.234	0.117	18.963	19.505
$X_1$ -Temp	1.009	0.154	0.653	1.364	0.358	0.093	0.144	0.572
$X_2$ -%SLP	0.323	0.154	-0.033	0.678	-0.004	0.093	-0.218	0.210
$X_1X_2$	-0.512	0.218	-1.015	-0.009	-	-	-	-
$X_1^2$	-0.784	0.164	-1.162	-0.406	-0.868	0.100	-1.098	-0.639

La Tabla 16 muestra los coeficientes de regresión, error estándar, intervalos de confianza ( $p < 0.05$ ) bajos y altos de los modelos matemáticos (Ecs. [4]-[7]) establecidos para cada variable de respuesta en factores codificados. Mediante los datos de la Tabla 16, se obtuvo respuestas predichas (Tabla 14), mostrando que estos datos se mantuvieron dentro de los parámetros del intervalo de confianza de cada modelo establecido.

#### 4.2.3. ANÁLISIS GRÁFICO DE LOS RESIDUOS DE LOS MODELOS PROPUESTOS PARA LAS VARIABLES DE RESPUESTA

Una vez obtenido los valores predichos que arrojan los modelos establecidos respectivamente para cada variable de respuesta, se pudo determinar la adecuación de dichos modelos mediante el análisis de residuos realizando una comparación entre los valores reales y predichos (Fig. 8).



**Figura 8.** Valores predichos vs valores reales de (A) concentración de kefirán (mg Glu/ml); (B) Reducción de pH durante la fermentación; (C) población de BAL (UFC/ml); (D) población de levaduras (UFC/ml).

El error estándar de cada modelo de respuesta se distribuyó normalmente, manteniendo una varianza homogénea. Esto permite determinar que el residual se distribuye normalmente y mantienen una varianza homogénea, lo que concuerda con la adecuación de los modelos y el  $R^2$  presentes en la Tabla 15, lo que asegura que los modelos utilizados son adecuados.

#### 4.2.4. OPTIMIZACIÓN DE LOS MODELOS SUGERIDOS PARA ENCONTRAR LOS PARAMETROS ÓPTIMOS (TEMPERATURA Y CONTENIDO DE LACTOSUERO EN POLVO) MEDIANTE LA FUNCIÓN DE DeseABILIDAD

La optimización (maximización) de las variables en estudio para encontrar los parámetros óptimos del bioproceso (temperatura y contenido de SLP) se realizó mediante la función de deseabilidad, la cual fue aplicada mediante la Ec. [1] que se encuentra descrita en la metodología.

$$D = [K^{0,25} L^{0,25} Y^{0,25} P^{0,25} L^{0,25}]^{(1/(0,25+0,25+0,25+0,25))} \quad [12]$$

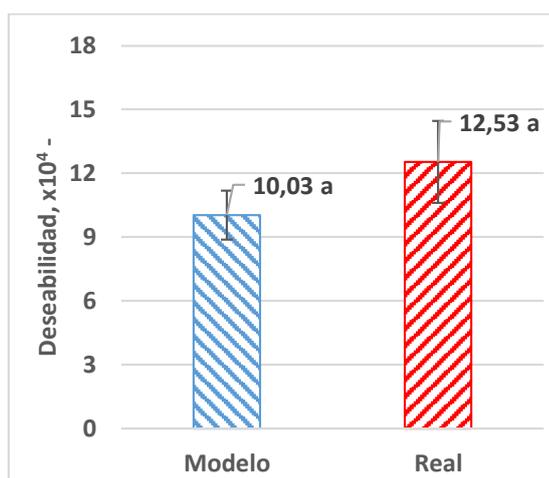
Para optimizar según la función de deseabilidad se tomó en cuenta que la producción de probióticos y prebióticos en la bebida funcional deben mantener el mismo nivel de importancia al momento de obtener parámetros óptimos. Para lo cual, en la Ec. [12] se muestra que para cada variable de respuesta se dio una igual importancia de 0.25 considerando que la sumatoria de los exponentes debe ser uno.

Al aplicar la optimización numérica a las ecuaciones de los modelos predichos para la concentración de kefirán, población de BAL, levaduras y la diferencia de pH, se obtuvo que existe una maximización de estas variables a una temperatura de 29.3°C y 71.4% (m/m) de SLP. Estos valores concuerdan con las representaciones gráficas 3D (Fig. 7) de los modelos sugeridos para cada variable.

Se realizó la validación de los parámetros óptimos que conforman la deseabilidad, mediante 6 repeticiones del bioproceso a esta condición. Para lo cual, en la Tabla 17 se muestra la media y su desviación estándar obtenida a partir de la repetición de dicho bioproceso junto con los datos obtenidos por el modelo de cada variable respectivamente.

**Tabla 17. Media ( $\bar{X}$ ) y desviación estándar (DE) de la maximización de los modelos matemáticos sugeridos de cada variable y la función de deseabilidad.**

	Kefirán (mg Glu/ml)		BAL (x10 <sup>8</sup> UFC/ml)		Levaduras (x10 <sup>8</sup> UFC/ml)		-ΔpH		Deseabilidad (x10 <sup>4</sup> )	
	Modelo	Real	Modelo	Real	Modelo	Real	Modelo	Real	Modelo	Real
$\bar{X}$	182.9	199.4	4.73	9.74	3.93	4.53	2.98	2.80	10.00	12.50
DE	20.1	13.6	0.11	0.75	0.05	0.51	0.07	0.03	1.16	1.92



**Figura 9.** Experimentos de validación para el modelo de la deseabilidad obtenido mediante la optimización de los modelos de las variables de respuesta. Los valores promedio se muestran en las columnas; las barras indican las desviaciones estándar y las letras iguales indica que no existe diferencias significativas.

En la validación del modelo de deseabilidad (Fig. 9), el estadístico  $t$  calculado de 0.04341 y el valor-p de 0.9666 mostró que no existe una diferencia significativa entre los valores predichos (10.03) y los valores reales (12.53). Por lo cual, se acepta la hipótesis nula.

Los resultados obtenidos de la prueba de hipótesis confirman la precisión del modelo de deseabilidad acogido para la optimización de concentración de kefirán, población de BAL, levaduras y la  $-\Delta\text{pH}$  a una temperatura de  $29.3^{\circ}\text{C}$  y 71.4% (m/m) de SLP.

Por lo tanto, los valores reales de cada variable respuesta presentados en la Tabla 17, son valores óptimos para los parámetros de temperatura y concentración de SLP obtenidos mediante la experimentación.

La concentración de 199.4 mg Glu/ml de kefirán es superior al comparar con resultados de otras investigaciones que obtienen su máxima concentración de 61.72 mg Glu/ml (Sabokbar, Moosavi-Nasab, & Khodaiyan, 2015). En el caso de la  $-\Delta\text{pH}= 2.80$ , concuerda con otras investigaciones donde la diferencia de pH en un tiempo de 48 h presenta valores similares a esta investigación (Balabanova & Panayotov, 2011).

Los valores óptimos de población de BAL de  $9.74 \cdot 10^8$  UFC/ml y levaduras de  $4.53 \cdot 10^8$  UFC/ml son similares a otros resultados obtenidos mediante la fermentación de lactosuero con gránulos de kéfir mediante condiciones de fermentación similares (Sabokbar, Moosavi-Nasab, & Khodaiyan, 2015).

Según Parra (2010), para que los probióticos tengan un efecto benéfico en la salud del huésped, deben ser ingeridos en rangos superiores a  $10^7$  UFC/ml y la cantidad mínima de bacterias probióticas es de  $10^8$  UFC/ml (NTE INEN 2395). En el caso de la concentración de levaduras, se encuentra dentro de los rangos establecidos, ya que el requisito mínimo de levaduras en kéfir es de  $10^4$  UFC/ml (NTE INEN 2395).

#### 4.2.5. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO SUGERIDO PARA LA CONCENTRACIÓN DE KEFIRÁN Y SU PROCESO DE EXTRACCIÓN.

La importancia de este estudio radica en la posibilidad de extraer el prebiótico conocido como kefirán. Para ello, se realizó una optimización solamente al modelo sugerido de la concentración de kefirán (Ec. [4]) con el fin de encontrar los parámetros que brinden la máxima concentración de este prebiótico. Después del análisis estadístico de optimización se obtuvo doce valores de condiciones óptimas donde este prebiótico alcanzó al máximo su concentración (Tabla 18).

**Tabla 18.** Condiciones óptimas de las variables independientes que maximizan el modelo cuadrático de regresión de la concentración de kefirán.

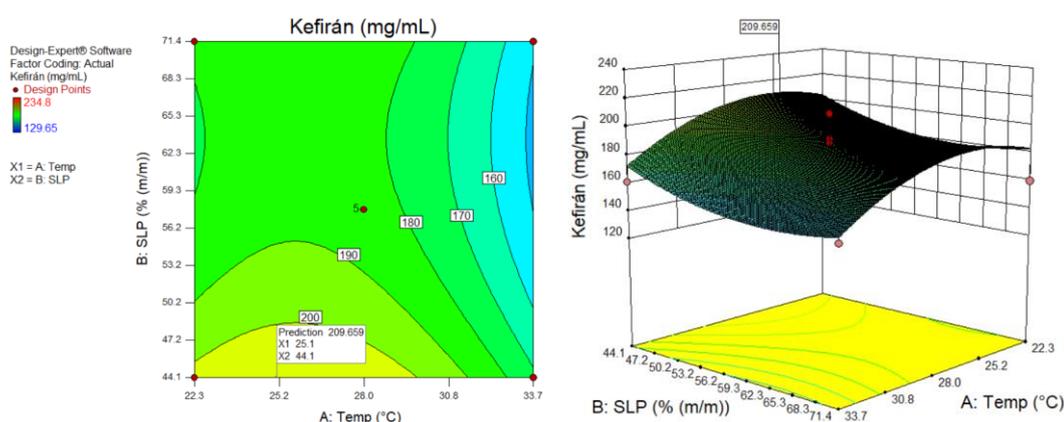
No.	T*, (°C)	SLP*, %(m/m)	Kefirán (K) (mg Glu/ml)	%Error Estándar
1	25.0	44.1	209.7	9.8
2	25.3	44.1	209.9	9.7
3	25.5	44.1	210.0	9.7
4	25.6	44.1	210.0	9.7
5	25.7	44.1	210.0	9.7
6	25.8	44.1	210.0	9.7
7	25.9	44.1	210.0	9.7
8	26.1	44.1	210.0	9.7
9	26.3	44.1	209.8	9.7
10	26.7	44.1	209.5	9.7
11	25.7	71.4	189.5	9.7
12	25.9	71.4	189.5	9.7

Otros autores también reportaron una temperatura óptima a 25°C (Montesanto et al, 2016; Zajsek, Gorsek, & M, 2013), mientras que, otros autores reportaron valores cercanos. Por ejemplo, han sido reportados valores de 24°C (Ghasemlou et al,

2012), 30°C (Dailin et al. 2015) y hasta 33°C (Maeda, Hiroaki, Zhu, & Mitsuoka, 2003).

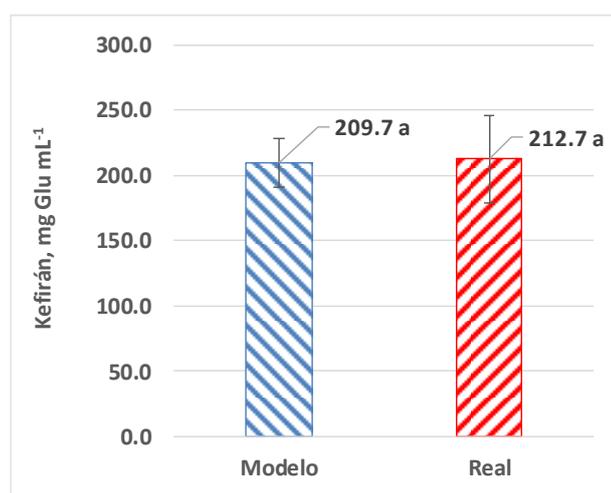
Los valores óptimos encontrados fueron de  $K_{\text{máx}} = 210 \pm 10$  mg Glu/ml, para valores de la temperatura entre 25 – 26.7°C y de contenido de SLP de 44.1% (m/m) SLP o de  $K_{\text{máx}} = 190 \pm 10$  mg Glu/ml, para temperaturas de 25.7 – 25.9°C y 77.1% (m/m) SLP (Tabla 18).

En la Fig. 10, se muestra uno de los valores óptimos obtenidos de las variables independientes que maximiza la concentración de kefirán.



**Figura 10.** Uno de los valores máximos sugeridos mediante la aplicación de optimización numérica para la concentración de kefirán.

Para validar el modelo sugerido, se realizaron siete experimentos similares, en uno de los puntos óptimos (25°C y 44.1% (m/m) SLP) sugeridos por el programa de cómputo. Los resultados obtenidos confirmaron la precisión del modelo de regresión para la concentración de kefirán, debido a que no existió diferencia significativa entre los valores predichos y reales (Fig. 11).



**Figura 11.** Experimentos de validación para el modelo del kefirán. Los valores promedio se muestran en las columnas, las barras indican las desviaciones estándar y la letra igual indican que no existe diferencia significativa ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ).

El proceso de extracción del kefirán se realizó a partir de cinco lotes de 100 l cada uno, produciendo  $3.1 \pm 1.3$  g/l de kefirán en el sobrenadante de cultivo.

Estos resultados son similares a los 1.91 g/l de kefirán reportados recientemente (Dailin et al., 2015) y los valores entre 1.5 – 2.5 g/l reportados anteriormente (Cheirsilp, Shimizu, & Shioya, 2007).

#### 4.3. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS, NUTRICIONALES Y SENSORIALES DEL PRODUCTO OBTENIDO

Una vez, obtenida la bebida funcional elaborada con los parámetros óptimos de deseabilidad se procedió a realizar análisis fisicoquímicos, nutricionales y organolépticos (Tabla 14).

**Tabla 19.** Resultados de las evaluaciones de las características físico-químicas y nutricionales de la bebida funcional realizada mediante los parámetros óptimos de deseabilidad.

Parámetro	Unidad	Resultado
Proteína Total	% (m/m)	0.82
Grasa	% (v/v)	0.37
Acidez	% (m/m) (Ac. Láctico)	1.13
Lactosa	% (m/v)	3.63
Viscosidad	cP (mPa·s)	4.02
Grado Alcohólico	°GL	2.09

El valor de la proteína obtenido (0.82% (m/m)) se encuentra dentro de los parámetros establecidos por NTE INEN 2609 donde indica que el límite mínimo de proteína en una bebida de suero de leche es de 0.40% (m/m). Además, este valor de proteína coincide con el reportado por otro autor (Assadi, 2008), el cual obtuvo para una fermentación de lactosuero con 3% de inóculo a 25°C, una bebida con 0.82% (m/m) de proteína total.

El contenido de grasa de la bebida funcional fue de 0.37% (v/v). Este valor es similar al porcentaje obtenido en una fermentación de SL con gránulos de kéfir, en la cual el mayor contenido de grasa que obtuvo una bebida con 3% de inóculo (Assadi, 2008).

La acidez titulable, expresada como ácido láctico, realizada a la bebida funcional fue de 1.3% (m/m) (Tabla 14). Esta acidez se considera dentro de los parámetros establecidos para el kéfir, el cual debe contener ácido láctico en rangos de 0.5 - 1.5% (m/m) de ácido láctico (NTA ANDINA 16007).

El contenido máximo permitido de lactosa en una bebida de suero, parcialmente deslactosada, es de 1.4% (v/v) (NTE INEN 2609). En comparación a esta norma técnica el contenido de lactosa en la bebida funcional de 3.63% (m/v) y no se encuentra dentro de los parámetros establecidos para una bebida deslactosada.

El SLP usado para esta fermentación tuvo un contenido inicial de lactosa de 65% (m/v) (Anexo 3). Entonces, después del proceso fermentativo el contenido de lactosa disminuyó aproximadamente en un 60%, lo cual representa una disminución de lactosa considerable, aunque no suficiente, después de 48 h de fermentación.

El consumo de lactosa durante el proceso fermentativo del lactosuero por medio de los gránulos de kéfir se corrobora con otras investigaciones, donde la disminución de lactosa en un periodo de 40 h representó el 40% (Sabokbar, Moosavi-Nasab, & Khodaiyan, 2015), además, el contenido de lactosa final en un pH final 4.1, es de 3.63 g/ml (Athanasiadis, Paraskevopoulou, Blekas, & Kiosseoglou, 2004). Por lo cual, la cantidad de lactosa después del tiempo de fermentación es proporcional al

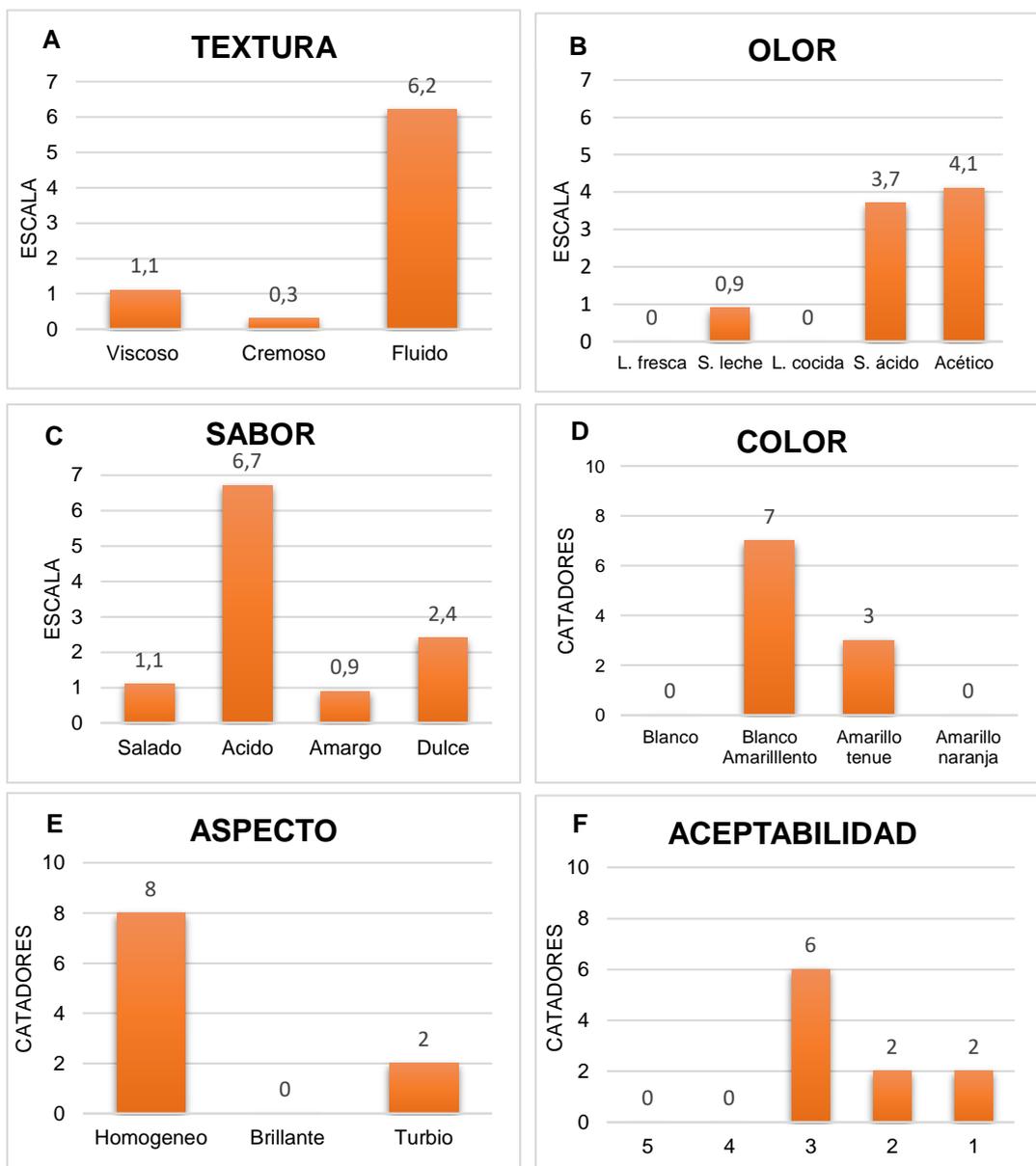
cambio de pH y al aumento de ácido láctico debido a la actividad de los microorganismos (Balabanova & Panayotov, 2011).

La bebida funcional realizada bajo las condiciones óptimas de fermentación tuvo una viscosidad de 4.02 cP. La viscosidad se incrementa debido a varios factores, como el tiempo y la temperatura de fermentación. Probablemente la viscosidad del producto final tenga relación a la producción del kefirán durante la fermentación y por la transferencia de los componentes del gránulo de kéfir a la bebida. Esta viscosidad es similar a la obtenida en otras investigaciones como resultado de una fermentación a 25°C (Sabokbar, Moosavi-Nasab, & Khodaiyan, 2015).

El kéfir es una bebida considerada de bajo contenido alcohólico, por lo cual, la NTE INEN 2395 indica que el nivel máximo de alcohol para un kéfir suave es de 1.05 % (m/v) y un kéfir fuerte es de 3.0 % (m/v). La bebida obtenida, clasifica como una bebida de característica similar a la de un kéfir fuerte debido al grado alcohólico de 2.09° GL que obtuvo después de la fermentación. Uno de los factores importantes para la producción de alcohol en bebidas fermentadas es el tiempo de fermentación. Otras investigaciones indican que para un tiempo estimado de 24 h de fermentación el contenido de alcohol es de 0.72 (g/cm<sup>3</sup>) (Assadi, 2008).

#### **4.3.1. ANÁLISIS SENSORIAL**

El análisis sensorial se realizó a la bebida funcional elaborada bajo las condiciones óptimas de la fermentación. Dichos análisis organolépticos fueron evaluados mediante apariencia y olfato-gustativa. En el caso de la apariencia, se evaluó el aspecto y color, mientras que, en el análisis de las características olfato-gustativas, se evaluó intensidad del aroma, el sabor y la textura.



**Figura 12.** Resultados del análisis sensorial (textura, olor, sabor, color, aspecto y aceptabilidad) de la bebida funcional realizada mediante los parámetros óptimos de deseabilidad.

Según la textura, su calificación obtenida por medio de los panelistas demostró que la bebida funcional es considerada como un producto fluido (Fig. 12A), debido a que este descriptor obtuvo la mayor puntuación de 6.2.

La Fig. 12B muestra la calificación dada para cada referencia del análisis sensorial del olor. Mediante los datos mostrados se puede apreciar que los catadores

definieron un conjunto de percepciones con los descriptores de: suero de leche, suero ácido y acético.

Según la rueda de descriptores de olores (Anexo 4), la bebida está considerada como un producto láctico acidificado. Donde el descriptor de acético muestra mayor calificación 4.1 en la escala creciente del olor, que se podría considerar como una característica otorgada por el proceso metabólico de las levaduras presentes en el gránulo de kéfir.

La Fig. 12C ilustra las puntuaciones brindadas por los panelistas en referencia a los descriptores del sabor (salado, ácido, amargo, dulce), donde, el sabor ácido es el que predomina; obteniendo una puntuación media de 6.7% en la escala creciente de intensidad de sabor. Al igual que el olor, esta característica es típica de una fermentación realizada por las levaduras.

Para la caracterización sensorial del color (Fig. 12D), el 70% de los catadores calificaron a la bebida como un color blanco amarillento, mientras que el 30% de los catadores atribuyeron un color amarillo tenue. La distinción puede darse debido a que el producto final mostró cualidades similares a la materia prima en referencia al color (suero de leche en polvo).

El color blanco amarillento de la bebida en la escala RGB corresponde a:

R= 250

G=130

B=150



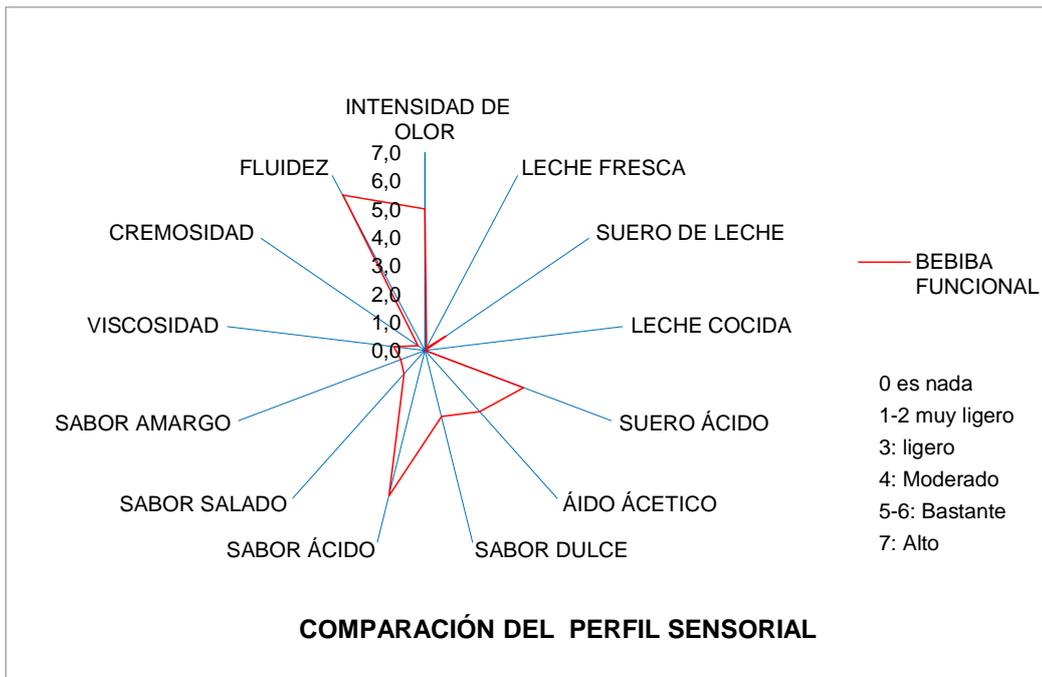
Según el criterio del 80% de los panelistas, la bebida funcional muestra un aspecto homogéneo y el 20% de los catadores atribuyeron una característica turbia a la bebida funcional (Fig. 12E). Mientras que, ningún catador, otorgó una característica brillante a la bebida funcional.

De igual manera, se evaluó la aceptabilidad de la bebida funcional, obteniendo una calificación de 3 (no me gusta, ni me disgusta) por parte del 60% de los encuestados,

20% de los encuestados, otorgaron una calificación de 2 (me disgusta moderadamente) y el 20% de los encuestados, otorgó una calificación de 1 (me disgusta mucho) (Fig. 12F).

Los resultados muestran que la bebida funcional no tiene una buena aceptabilidad mediante sus características organolépticas. Esto puede ser debido a que la población no se encuentra familiarizada con las características organolépticas típicas de una fermentación por medio de gránulos de kéfir. Sin embargo, existe un resultado de análisis organoléptico similar a los reportados en este estudio (Sabokbar, Moosavi-Nasab, & Khodaiyan, 2015), donde muestra que la aceptabilidad de la bebida de lactosuero y jugo de manzana fermentada por gránulos de kéfir tuvo una calificación aproximada a 3, en una escala de 1 a 5.

Estos resultados pueden ser consecuencia del prolongado tiempo de fermentación, ya que, al tratarse de una heterofermentación, existe la producción de varios metabolitos secundarios, como el ácido acético, que afecta de manera negativa a las características organolépticas. Según las observaciones brindadas por los panelistas indican que existe una excesiva fermentación del producto, provocando que el producto tenga características organolépticas consideradas no tan agradables.



**Figura 13.** Representación gráfica del perfil sensorial de la bebida funcional

La Fig. 13 muestra los resultados del análisis sensorial otorgado por los panelistas. El perfil sensorial indica que la bebida funcional es un producto con predominante intensidad de olor, bastante fluido, bastante sabor ácido. A demás es un producto que no presenta viscosidad, cremosidad, sabor amargo ni olor a leche cocida. Mientras que, el olor a suero ácido, ácido acético están presentes en un rango moderado.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1. CONCLUSIONES**

- La técnica analítica fenol-ácido sulfúrico es adecuada para la cuantificación de kefirán, debido a que diferentes concentraciones de glucosa permitieron obtener una curva patrón mediante la ley de Lambert Beer (Rodríguez, Garrido, Martínez, & García, 2011), mostrando la linealidad necesaria entre absorbancia y concentración de glucosa.
- La temperatura de 29.3°C y el contenido de SLP de 71.4% (m/m) se consideran parámetros óptimos, donde, se maximizó una función de deseabilidad formada por los cuatro modelos de cada variable de respuesta (concentración de kefirán, población de BAL, población de levaduras y reducción de pH) mediante un aporte ponderado equitativamente.
- Se extrajo  $3.1 \pm 1.3$  g/l de kefirán de un caldo fermentativo obtenido a partir de un bioproceso realizado a una temperatura de 25°C y un contenido de SLP de 44.1% (m/m). Dichas condiciones fueron obtenidas estadísticamente considerando únicamente la maximización del kefirán.
- Los niveles de proteína, grasa, acidez, grado alcohólico, población de bacterias ácido-lácticas y levaduras cumplen con los requisitos establecidos de acuerdo con las normativas NTE INEN 2609 NTE INEN 2395 NTA ANDINA 16007.
- El análisis sensorial aplicado a la bebida funcional realizada por los parámetros óptimos de la función de deseabilidad permitió diagnosticar que este producto contiene un penetrante olor acético y sabor ácido, por lo cual,

el producto no fue aceptado por el 100% de los catadores, manteniendo una calificación entre 1 a 3 en una escala máxima de 5.

- Se acepta la hipótesis alternativa debido a que los modelos matemáticos aplicados permiten obtener parámetros óptimos de fermentación de lactosuero mediante gránulos de kefir con el fin de desarrollar un bioproceso para obtener una bebida funcional con características probióticas y prebióticas.

## **5.2 RECOMENDACIONES**

- Se recomienda la utilización directa de suero de leche dulce, ácido o mezclas de estos, en lugar del suero de leche en polvo, lo que podría disminuir los costos de elaboración.
- Se recomienda emplear sacarosa, en lugar, de glucosa, para la etapa de fermentación, abaratando el costo del medio de cultivo.
- Realizar un estudio controlando el pH durante el tiempo de fermentación, con el fin de controlar el penetrante olor acético y sabor ácido en el producto final.
- Se recomienda realizar un estudio de características organolépticas de olor y sabor del producto utilizando aditivos comerciales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Araya, H. (2003). Alimentos funcionales y saludables. *SCIELO*, 132-139.
- Arévalo, H., & Arias, G. (2008). Determinación de la concentración de inóculo y tiempo de fermentación, utilizando microbiota de los granos de kefir como agente biológico y suero de leche como sustrato. *Revistas de investigación UNMSM*, 16-22.
- Aspasia, a., Chatzipaschali, & Anastassios, G. (2012). Biotechnological utilization with a focus on anaerobic treatment of cheese whey: Current status and prospects. *Energies*, 3494-3495.
- Assadi. (2008). Application of whey in fermented beverage production using kefir starter culture. *Nutrition & Food science*, 121-127.
- Athanasiadis, I., Paraskevopoulou, A., Blekas, G., & Kiosseoglou, V. (2004). Development of a novel whey beverage by fermentation with kefir granules. Effect of various treatments. *Biotechnology Prog*, 1091-1095.
- Balabanova, T., & Panayotov, P. (2011). Obtaining functional fermented beverages by using the kefir grains. *Procedia Food Science*, 1653-1659.
- Bérodier, F., Lavanchy, P., Zannoni, M., Casals, J., Herrero, L., & Ademo, C. (1997). *Guía para la evaluación olfato-gustativa de los quesos de pasta dura o semidura*. Poligny: Gecotef Company .
- Blanco, S., Delahaye, P., & Fraganas, N. (2006). Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Revista Facultad de Agronomía (Maracay)*, 131-144.
- Box, G., & Wilson, K. (1951). On the Experimental attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society*, 1-41.
- Candioiti, L., De Zan, M., Cámara, M., & Goicoechea, H. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 123-138.
- Chanfrau, J., Pérez, J., Fiallos, M., Rivera, L., Abril, V., MJC, G., & Toledo, L. (2017). Milk Whey-From a Problematic Byproduct to a Source of

Valuable Products for Health and Industry: An overview from Biotechnology. *La Prensa Medica Argentina*, 2-11.

- Cheirsilp, B., Shimizu, H., & Shioya, S. (2007). Kinetic modeling of kefir production in mixed culture of *Lactobacillus kefirianofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 570-579.
- Chen, H., Wang, S., & Chen, M. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture dependent and culture independent methods. *FOOD MICROBIOLOGY*, 492-501.
- Cordero, G. (2013). El análisis sensorial y el panel de cata. En G. Cordero, *Aplicación del análisis sensorial de los alimentos en la cocina y en la industria alimentaria* (págs. 9-18). Sevilla.
- Dailin, D., Elsayed, E., Othman, N., Malek, R., Phin, H., Aziz, R., . . . M. (2015). Bioprocess development for kefir production by *Lactobacillus kefirianofaciens* in semi industrial scale bioreactor. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 495-502.
- Dubois, M., Gilles, H. J., Rebers, A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 350-356.
- Erickson, L., Fayet, E., Kakumanu, B., & Lawrence, D. (2004). Lactic Acid Fermentations. *National Agriculture Biosecurity Center*, 7-10.
- FAO. (2016). *Probióticos en los alimentos-Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*. Roma.
- Farnworth, E. (2005). Kefir- A complex Probiotic. *Food science and technology*, 1-17.
- Geiger, B., Nguyen, H., Wenig, S., Lorenz, C., Kitti, R., & G, M. (2016). From by-Product to Valuable Components: Efficient Enzymatic Conversion of Lactose in Whey Using Galactosidase from *Streptococcus Thermophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, 45-53.
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Jahanbin, K., Gharibzadeh, S., & Taheri, S. (2012). Structural investigation and response surface optimization for improvement of kefir production yield from a low-cost culture medium. *Food Chemistry*, 383-389.

- González, V., Rodeiro, C., Sanmartín, C., & Vila, S. (06 de 2014). *SGAPEIO*.  
Obtenido de SGAPEIO:  
<http://www.seio.es/descargas/Incubadora2014/GaliciaBachillerato.pdf>
- Gutiérrez, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*.  
Mexico D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Guzel, Z., Tugba, K., & Greene, A. (2010). Kefir and Koumiss: Microbiology and  
technology. En F. Yildiz, *Development and manufacture of yogurt and  
other functional dairy products* (págs. 143-1477). New York: Taylor and  
Francis Group.
- Hernández, A., Robles, V., Angulo, J., De la Cruz, J., & Garcia, H. (2007).  
Preparation of a Whey-Based Probiotic with *Lactobacillus reuteri* and  
*Bifidobacterium bifidum*. *Food Technology and Biotechnology*, 27-31.
- Hernández, M., & Vélez, J. (2014). Suero de leche y su aplicación en la  
elaboración de alimentos funcionales. *Temas selectos de ingeniería de  
alimentos*, 13-22.
- Hiroaki, M., Xia, Z., Shiho, S., Kiyosaki, S., & Shinichi, K. (2004). Structural  
Characterization and Biological activities of an Exopolisaccharide Kefiran  
Produced by *Lactobacillus Kefiranofaciens* WT-2B. *Journal of  
Agriculture and Food Chemistry*, 5533-5538.
- Hughenoltz, J. (2008). Review: The lactic acid bacterium as a cell factory for food  
ingredient production. *Dairy Journal International*, 466-475.
- INAMHI. (Marzo de 2017). *INAMHI*. Obtenido de INAMHI:  
[http://www.serviciometeorologico.gob.ec/meteorologia/bolhist/cli/2017/MENSUAL/bol\\_men\\_03.pdf](http://www.serviciometeorologico.gob.ec/meteorologia/bolhist/cli/2017/MENSUAL/bol_men_03.pdf)
- Jiménez, M. (2015). Superficie de respuesta mediante un diseño central  
compuesto. *Revista Varianza*, 31-36.
- Jovanovic, S., Barac, M., & Macej, O. (2005). Whey proteins-Properties and  
possibility of application. *Mljekarstvo*, 215-233.
- Kilic, D., Demirhan, E., Ozel, B., & Ozbek, B. (2015). Kefir grains biomass  
productions: Influence of different culturing conditions and examination of  
growth kinetic models. *Journal of Food Process Engineering*, 1-9.  
Obtenido de Wiley Online Library.

- La Riviere, J., & Kooiman, P. (1967). Kefiran, a Novel Polisaccharide. Produced in the Kefir Grain by *Lactobacillus brevis*. *Microbiologie*, 269-278.
- Lanming, C., Shuang, X., & Yingjie, P. (2015). Diversity of Lactic Acid Bacteria in Chinese Traditional Fermented Food. En R. Ravishankar, & B. Jamuna, *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods* (págs. 3-11). New York : CRC Press.
- Londero, A. (2012). Alimentos funcionales: Obtención de un producto probiotico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kefir. *Repositorio UNLP*, 1-50.
- Lopitz, F. R., Elguezabel, N., & Garaizar, J. (2006). Kefir: A symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*, 67-74.
- Maeda, Hiroaki, Zhu, X., & Mitsuoka. (2003). New Medium for the Production of Exopolysaccharide (OSKC) by *Lactobacillus kefirianofaciens*. *Bioscience and Microflora*, 45-50.
- Manfugás, J. (2007). *Evaluación sensorial de los alimentos*. Ciudad de la Habana: Editorial Universitaria.
- Marwaha, S., & Kennedy, J. (1988). Whey: Pollution Problem and Potential Utilization. *International Journal Food Science & Technology*, 23-36.
- Montesanto, S., Calo, G., Cruciata, M., Settanni, L., Brucato, V., & Carruba, V. (2016). Optimization of environmental conditions for kefir production by kefir grain as scaffold for tissue engineering. *Chemical engineering transactions*, 607-612.
- Montgomery, D. (2004). Diseño y Análisis de Experimentos. En D. Montgomery, *Diseño y Análisis de Experimentos* (págs. 427-500). Mexico: Limusa.
- Montgomery, M. (2002). *Diseño y Análisis de experimentos*. Mexico: Limusa Wiley.
- Myres, R., & Montgomery, D. (2009). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. En R. Myres, & D. Montgomery, *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. New York: Wiley.

- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genovois, C., & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales; fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Revista Diaeta*, 20-33.
- Olivera, J. (07 de 2011). Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. *Repositorio digital de la Universidad de la República*, 1-45.
- Orozco, M. (16 de 02 de 2015). Un tercio de la producción láctea se dedica al queso. *Lideres*.
- Papavasoliou, G. K., Rapti, A., Sipsas, V., Soupioni, M., & Kourtinias, A. (2007). Production of freeze-dried kefir culture using whey. *International dairy journal*, 247-254.
- Parra, R. (2009). Importance in the Food Industry. *Repositorio de la Universidad Nacional de Medellín*, 67-82.
- Parra, R. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Revista Bio-Agro*, 93-105.
- Pescuma, M., Valdez, F. d., & Mozzi, F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Appl Microbiol Biotechnology*, 1-14.
- Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M., & A, A. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocoloids*, 1261-1269.
- Pogacic, T., Sinko, S., Zamberlin, S., & D, S. (2013). Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*, 3-14.
- Puerta, I. (2010). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Avances Técnicos cenicafé*, 3-12.
- Pustaña, G. (2012). *Comparación de la gomas xantana y carragenina en las propiedades reológicas de una bebida con lactosuero "Vida útil"*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato- Ecuador.
- Ramírez, J., Ulloa, P., Velázquez, G., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias Lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 3-16.

- Requelme, N., & Bonifaz, N. (2012). Caracterización de Sistemas de Producción Lechera de Ecuador. *Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador*, 55-68.
- Rig, A., & Blanco, J. (2002). Prebióticos y Probióticos, una relación beneficiosa. *Revista cubana Aliment Nutr*, 63-68.
- Rimada, P., & Abraham, A. (2001). Polysaccharide production by kefir during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 653-661.
- Rodríguez, J., Garrido, H., Martínez, A., & García, M. (2011). Exactitud y Errores de la oximetría de Pulso. En R. A. Méndez José, *V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB* (págs. 755-763). Habana.
- Rosa, D., Dias, M., Grzeskowiak, L., Reis, S., Peluzio, M., & L, C. (2017). Milk Kefir; nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research*, 1-15.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic Bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 197-215.
- Sabokbar, N., Moosavi-Nasab, M., & Khodaiyan, F. (2015). Preparation and characterization of an apple juice and whey based novel beverage fermented using kefir grains. *Food Science and Biotechnology*, 2095-2104.
- Schneider, R., Fernández, F., Agular, M., Guerrero, I., Alpuche, A., & Ponce, A. (2006). Partial characterization of a class pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat. *Food Control*, 909-915.
- Teixeira, K., Pereira, M., & Freitas, R. (2010). Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture. *Bioresourcce technology*, 8843-8844.
- Tomotari, M. (2015). *Daiwa Pharmaceutical Co, Ltda*. Obtenido de Daiwa Pharmaceutical Co, Ltda: <http://www.daiwa-pharm.com/english/product/kefiran.html>
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Madrid: Editorial Medica Panamericana.

- Urquiza, E., Mendez, M., & Vélez, J. (2014). Productos Lacteos funcionales, fortificados y sus beneficios en la salud humana. *Temas Selectos de ingeniería en alimentos*, 3-14.
- Valencia, D., & Ramírez, M. (28 de 06 de 2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos*, 27-31. Obtenido de Ciencia y Cultura Elementos.
- Vanaclocha, A., & Requena, J. (2003). *Proceso de conservación de alimentos*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Vázquez, S., Suárez, H., & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobinas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de nutrición*, 199-204.
- Vedamuthu, E. (2013). Other fermented and culture-containing milks. En P. Chandan, & k. Arun, *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* (págs. 393-394). Minnesota: Editorial Office.
- Zajsek, K., Gorsek, A., & M, K. (2013). Cultivating Conditions Effects on Kefiran Production by the Mixed Culture of Lactic Acid Bacteeeria Imbedded within Kefir Grains. *Food Chemistry*, 970-977.
- Zavala, L., Piermaria, J., & Abraham, A. (2012). Caracterización fisicoquímica de geles de kefiran, un polisacárido producido por bacterias lácticas. *Food Hydrocolloids*, 684-690.
- Zeynep, G., Tugba, k., & Greene, A. (2010). Kefir and Kumis: Microbiology and Techonology. En F. Yildiz, *Development and Manufacture of yogurt and other functional dairy products* (págs. 143-156). New York: Taylor and Francis Group.
- Zolfi, M. K., Mousavi, M., & Hashemi, M. (2014). Development and characterization of the kefiran-whey protein isolate-TiO<sub>2</sub> nanocomposite films. *Biological Macromolecules*, 340-345. Recuperado el 18 de 09 de 2016



Anexo 2. Preparación de los sabores de referencia para la evaluación.

Sabor	Molécula	Solución madre (SM)	Nivel de sabor representado	Preparación con suero de leche fresco
Salado	NaCl	Solubilizar 4.7 g de NaCl en 100 ml de agua	2 sobre 7	Tomar por medio de una pipeta 12.5 ml de la SM, mezclar con 200 ml de suero de leche fresco. Adicionar 17.5 ml de agua. Mezclarlo todo con un homogeneizador.
	NaCl	Tomar la misma SM de arriba	6 sobre 7	Tomar por medio de una pipeta 30 ml de SM, mezclar con 200 ml de suero de leche fresco y mezclar con un homogeneizador.
Ácido	Ácido Cítrico	Solubilizar 0.8 g de ácido cítrico en 30 ml de una solución de NaCl a 330 mg/100 ml*	2 sobre 7	Agregar los 30 ml preparados en 200 ml de suero de leche y mezclar con el homogeneizador.
	Ácido Cítrico	Solubilizar 2 g de ácido cítrico en 30 ml de una solución de NaCl a 330 mg/100 ml	6 sobre 7	Agregar los 30 ml preparados en 200 ml de suero de leche y mezclar con el homogeneizador.
	Ácido Acético	Solubilizar 2 g de vinagre blanco en 30 ml de una solución de NaCl a 330 mg/100 ml	2 sobre 7	Agregar los 30 ml preparados en 200 ml de suero de leche y mezclar con el homogeneizador.
	Ácido Acético	Solubilizar 2 g de vinagre blanco en 30 ml de una solución de NaCl a 330 mg/100 ml	6 sobre 7	Agregar los 30 ml preparados en 200 ml de suero de leche y mezclar con el homogeneizador.
Amargo	Cafeína	Solubilizar 0.7 g de cafeína en 100 ml de agua.	2 sobre 7	Tomar con una pipeta 50 ml de SM, añadirlo a 200 g de requesón. Completar añadiendo 15 ml de agua y mezclar bien con la ayuda de un homogeneizador.
	Cafeína	Tomar la misma SM de arriba.	6 sobre 7	Tomar con una pipeta 25 ml de SM, añadirlo a 200 g de requesón.  Completar añadiendo 5 ml de agua y mezclar bien con la ayuda de un homogeneizador.
Dulce	Sacarosa	Solubilizar 15 g de fructosa en 100 ml de agua.	2 sobre 7	Tomar con una pipeta 6 ml de SM, añadirlo a 200 g de requesón. Completar añadiendo 24 ml de agua y mezclar bien con la ayuda de un homogeneizador.
	Sacarosa	Tomar la misma SM de arriba.	6 sobre 7	Tomar con una pipeta 20 ml de SM, añadirlo a 200 g de requesón. Completar añadiendo 24 ml de agua y mezclar bien con la ayuda de un homogeneizador.

Anexo 3. Ficha técnica del suero en polvo (materia prima)

	<b>FICHA TÉCNICA DE PRODUCTO TERMINADO</b>	Código: IFFT-009
---	--	------------------

<b>NOMBRE COMERCIAL</b>	<b>SUERO DE LECHE</b>
<b>MARCA</b>	Materia Prima Suero de leche deshidratado

<b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b>	Color	Uniforme, blanco, cremoso
	Olor	Normal característico
	Sabor	Normal característico
	Estado	Polvo fino homogéneo

<b>ANÁLISIS FISICOQUÍMICO</b>	Humedad	Máximo 4 %
	Acidez	Máx. 0.16% como ácido láctico
	Solubilidad	Máx. B
	Partículas	0.60 ±0.05 %
	Grasa	Máx. 5 %
	Proteínas	Mín. 11 %
	Lactosa	Mín. 65 %
	Cenizas	Máx. 9.5 %

<b>ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO</b>	Recuento Total UFC/G	< 10.000
	Patógenas	Ausentes
	Coliformes	< 10
	Enterobacterias	Ausentes
	Hongos y levaduras	< 100

PRESENTACIONES COMERCIALES Y MATERIAL DE ENVASE		
Presentación 25 Kg	Envase Interno	Funda plástica
	Envase Externo	Tres capas de papel craft.

<b>TIPO DE CONSERVACIÓN</b>	Mantener en un lugar fresco.
<b>VIDA ÚTIL</b>	12 meses a partir de la fecha de elaboración.

## Anexo 4. Resultados de laboratorio



### UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN 002 – CONEA – 2010 – 129 – DC.  
Resolución No. 001 – 073 – CEAACES – 2013 – 13

#### FICAYA

Laboratorio de Análisis Físicos, Químicos y Microbiológicos

Informe N°:	02 - 2018
Análisis solicitado por:	Sra. Paola Alvarado
Empresa:	Particular
Muestreado:	Propietario
Fecha de recepción:	08 de enero de 2018
Fecha de entrega informe:	15 de enero de 2018
Ciudad:	Ibarra
Provincia:	Imbabura
Muestra:	Suero de leche fermentado
No. de Lote	No aplica
No. Unidades Analizadas	1

Parámetro Analizado	Unidad	Resultado	Metodo de ensayo
Proteína Total	%	0,82	INEN 465
Grasa	%	0,37	INEN 165

Los resultados obtenidos pertenecen exclusivamente para las muestras analizadas

Atentamente:

Bloq. José Luis Moreno  
Técnico de Laboratorio



#### Visión Institucional

La Universidad Técnica del Norte en el año 2020, será un referente en ciencia, tecnología e innovación en el país, con estándares de excelencia institucionales.

Av. 17 de Julio 9-21 y José María  
Córdova, Barrio El Clavo.  
Teléfono: (06) 2667000  
Fax: Ext. 1711.  
Email: [un@un.edu.ec](mailto:un@un.edu.ec)  
[www.un.edu.ec](http://www.un.edu.ec)  
Ibarra - Ecuador



**Multianalityca** Cia. Ltda

Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de Calidad

### INFORME DE RESULTADOS

INF.DIV-FQ.28378

SA 35769a

Cliente:	ALVARADO CONDO PAOLA MARGARITA	Lote:	---
Dirección:	CALLE RIO AMAZONAS 0188	Fecha Elaboración:	---
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Vencimiento:	---
Muestra de:	SUERO	Fecha Recepción:	10/07/2017
Descripción:	LACTO SUERO FERMENTADO	Hora Recepción:	8:24
		Fecha Análisis:	10/07/2017
		Fecha Entrega:	12/07/2017
		Código:	----

Características Muestra	
Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	Líquido
Contenido Declarado:	2L
Contenido Encontrado:	----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio

#### RESULTADO FISICO-QUIMICO

PARAMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO INTERNO	METODO DE REFERENCIA
*ACIDEZ	% (ac. Láctico)	1.13	MFQ-07	AOAC 947.05

Nota 1: laboratorios de ensayo acreditado por el SAE con acreditación N° OAE LE C 09-008

Nota 2: "Los ensayos marcados con (\*) no están incluidos en el alcance de acreditación del SAE"

Nota 3: "El ensayo de acidez se realizó con métodos acreditados en leche y derivados pero no se encuentra dentro del rango acreditado por el SAE"



  
Ing. Ligeth Guevara  
JEFE DIVISION FISICO-QUIMICO

Dirección: Cas. Edmundo Chiriboga N47-154 y Jorge Anibal Pérez Telf: 2267895 - 2269743 - 2444670 Cel: 0958850754 - 0998281144

EDICION RG: 05

www.multianalityca.com Quito - Ecuador

RFQ-4.1-6 Página 1/1

**INFORME DE RESULTADOS**

INF.DIV-IN.21635

SA 35770a

Cliente:	ALVARADO CONDÓ PADLA MARGARITA	Lote:	---
Dirección:	CALLE RIO AMAZONAS 0188	Fecha Elaboración:	---
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Vencimiento:	---
Muestra de:	SUERO	Fecha Recepción:	10/07/2017
Descripción:	LACTO SUERO FERMENTADO	Hora Recepción:	8:25
		Fecha Análisis:	10/07/2017
		Fecha Entrega:	25/07/2017
		Código:	---
CONDICIONES DEL ANÁLISIS VISCOSIDAD:		Temperatura:	25 °C
		Velocidad:	100 rpm
		Splíndulo:	61

Características Muestra	
Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	Líquido
Contenido Declarado:	2L
Contenido Encontrado:	----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio

**RESULTADO INSTRUMENTAL**

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO INTERNO	MÉTODO DE REFERENCIA
LACTOSA	%	3.62	MIN-50	HPLC
VISCOSIDAD	cp	4.02	MIN-29	MAI-03/AOAC 991.36
GRADO ALCOHOLICO	* GL	2.09	MIN-82	CG

Nota 1: \*Ensayo subcontratado.



  
Quim. Alm. Mercedes Parra  
JEFE DE DIVISION INSTRUMENTAL

## Anexo 5. Fotografías del proceso de elaboración del producto

### Mezclado



### Homogenización



### Esterilización



### Inoculación



## Incubación

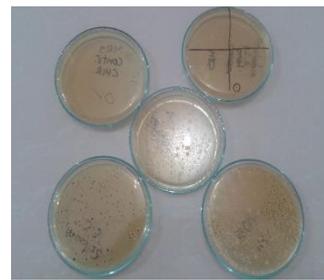
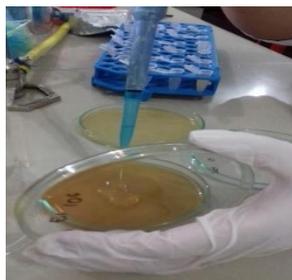


## Anexo 6. Técnicas analíticas

### Medición de pH



### Análisis Microbiológico



### Determinación de Kefiran





### Extracción de kefiran

