



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

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

### **CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

#### **ARTICULO CIENTÍFICO**

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

**Autor: Paola Margarita Alvarado Córdor**

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

**ASESORES: Dra. Lucía Yepéz**

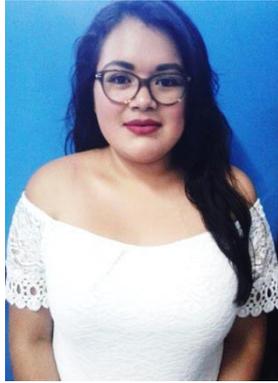
**MSc. Jimmy Nuñez**

**Msc. Silvio Álvarez**

**Ibarra – Ecuador**

**Junio 2018**

## Datos informativos



**Apellidos: Alvarado Córdor**

**Nombres: Paola Margarita**

**C. Ciudadanía: 100408671-4**

**Teléfono Celular: 0989273637**

**Correo electrónico: [paiito\\_alvarado93@hotmail.com](mailto:paiito_alvarado93@hotmail.com)**

**Dirección: Imbabura – Antonio Ante- Atuntaqui**

**Año: 2018**

## REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

FICAYA UTN

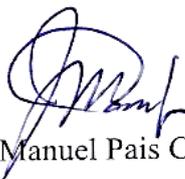
FECHA: 04-06-2018

**PAOLA MARGARITA ALVARADO CÓNDOR.** “DESARROLLO DE UN BIOPROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL A PARTIR DE LACTOSUERO EN POLVO Y GRÁNULOS DE KEFIR ” / TRABAJO DE GRADO. Universidad técnica del norte, Carrera de Agroindustria. Ibarra. Ec. Junio 2018

**DIRECTOR:** Ing. José Manuel Pais Chanfrau. PhD.

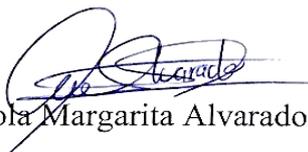
El objetivo principal de esta investigación fue desarrollar un bioproceso para la obtención de una bebida funcional a partir de lactosuero en polvo y gránulos de kéfir.

**Fecha:** 5 de junio del 2018



Ing. José Manuel Pais Chanfrau, PhD

**Director de trabajo de titulación**



Paola Margarita Alvarado Córdor

**Autor**

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

Alvarado Córdor Paola Margarita  
Universidad Técnica del Norte

## 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 nutraceuticas. 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 concentración de bacterias ácido-lácticas (BAL), la concentración 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 compuesto central, optimización.

## SUMMARY

Whey is a derivate 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 kefir values of 199.4 mg Glu / ml, LAB 9.74 · 10<sup>8</sup> CFU / ml, yeast 4.53 · 10<sup>8</sup> 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 kefir, 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 ± 9.77 mg Glu / ml. Validation was carried out through 3 additional experiments, obtaining a result of 216.06 ± 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 ± 1.3 g / l of kefirán was extracted.

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

## INTRODUCCIÓN

En Ecuador el 31% de la producción de leche es destinada a la fabricación de quesos, siendo el lactosuero el principal subproducto obtenido después del proceso. Éste representa entre el 80-90% del volumen de la leche utilizada para la obtención de quesos y se lleva consigo entre el 50-55% de todos los nutrientes de la leche (Rimada, 2001).

Por su excesivo volumen generado, el lactosuero no se encuentra totalmente usado para la producción de nuevos productos para la industria en general, creando principalmente problemas de contaminación o costos de tratamiento de efluentes en el caso de ser realizado.

Una manera para disminuir el impacto que este subproducto produce es mediante su valorización como materia prima para la producción de diferentes productos como: alimentos, biocombustibles, farmacéuticos, nutraceuticos, etc.

Por su parte, el kefir es una bebida fermentada similar al yogurt, muy popular en el este de Europa. Kefir es producido por el gránulo de kefir, constituido por un consorcio de algunas bacterias ácido lácticas y levaduras que viven dentro del gránulo del kefir.

El principal constituyente de este gránulo es el kefirán, un polímero formado por enlaces de glucosa y galactosa en proporciones aproximadamente iguales. Recientes estudios han demostrado varias propiedades beneficiosas de este biopolímero en farmacéutica y alimentaria.

Por otro lado, la metodología de superficie de respuesta (MSR) es una herramienta del diseño de experimentos muy utilizada en la industria (Ghasemlou et al. 2012; y que permite optimizar determinada variable de respuesta y encontrar la combinación de variables independientes que permite lograrlo. El diseño compuesto central (DCC) es uno de los arreglos de la MSR más populares y se basa en distribuir los experimentos alrededor de un punto central distribuyendo el resto de los experimentos de manera equidistante alrededor de éste. (Gutierrez, 2008).

En algunas investigaciones se toman en cuenta parámetros como temperatura, tiempo, y la proporción del medio de cultivo, entre otros recursos fermentativos importantes para el crecimiento del gránulo de kefir para producir sustancias como probióticos y prebióticos.

Por ello, la importancia de crear un alimento funcional que sea un medio óptimo para un crecimiento adecuado de probióticos y prebióticos; tal es el caso, un medio de cultivo conformado por lactosuero y nutrientes que beneficien la obtención de estos.

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un bioproceso para la obtención de una bebida funcional a partir de lactosuero en polvo y gránulos de kefir, para lo cual se encontraron parámetros óptimos que permitan la maximización de probióticos y prebióticos.

## Objetivo general

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

## 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.

## METODOLOGIA

### Validación de la técnica analítica para la cuantificación de 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.

### Condiciones del experimento

Se empleó gránulos frescos de kéfir de [www.kefir.ec](http://www.kefir.ec). Los gránulos fueron mantenidos

en leche fresca y pasteurizada de 4 – 8°C, recambiándola cada dos días. En cada experimento, 100 g de medio de cultivo fueron inoculados con 3.73% (m/m) de gránulos de kéfir como ha sido reportado por otros (Sabokbar, Khodaiyan, and Moosavi-Nasab 2015). Antes de ser inoculados, los gránulos de kéfir fueron lavados con abundante agua destilada.

En todos los medios de cultivo se mantuvo los sólidos disueltos en 14% Brix, de manera similar como se reportó en otros estudios (Sabokbar, Moosavi-Nasab, and Khodaiyan 2015).

Las cantidades de suero en polvo empleadas fueron de 38.5 a 77% (m/m) de acuerdo a las condiciones del diseño de experimentos (Maeda et al. 2011). Para mantener los 14% Brix en cada variante, se adicionó cantidades definidas de glucosa al 77% (m/v).

Adicionalmente, el medio fue suplementado con una solución de sales 10X formada por 1% (m/v) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5% (m/v)  $\text{MgSO}_4$  y 1% (m/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Todas las variantes fueron ajustadas a pH 6.8, empleando 98% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ó 0.1 M NaOH, según fuese necesario.

Todos los experimentos duraron 48 h en un agitador oscilante a 100 rpm y controlando la temperatura entre 20 y 36°C, de acuerdo con los valores sugeridos por el DCC de experimentos.

### Diseño experimental

La metodología de superficie de respuesta fue usada para determinar el efecto de los factores previamente mencionados, mediante el empleo de un paquete estadístico *Desing Expert 10.0 (Stat-Easy)*. Trece tratamientos (Tabla 1.) 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 1.** Tratamientos de 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

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

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

Donde; K, L, Y, P son la concentración de kefirán (mg Glu/ml), BAL (UFC/ml), levaduras (UFC/ml) y la reducción de pH (-ΔpH), respectivamente, durante un tiempo de fermentación (48 h) igual para todos los tratamientos; m<sub>1</sub>, m<sub>2</sub>, m<sub>3</sub>, m<sub>4</sub> 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:

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

Donde F es la variable de respuesta transformada o directa de la concentración de kefirán (mg Glu/ml), concentración de BALs (UFC/ml), concentración de levaduras (UFC/ml) y caída de pH (-); β<sub>0</sub> es la media del efecto general del modelo; β<sub>1</sub> representa el efecto del factor X<sub>1</sub> (temperatura); β<sub>2</sub> representa el efecto del factor X<sub>2</sub> (contenido de

lactosuero); β<sub>12</sub> es el efecto de la interacción entre los factores X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>; β<sub>11</sub> representa el efecto cuadrático de la temperatura (X<sub>1</sub>); β<sub>22</sub> representa el efecto cuadrático del % de lactosuero (X<sub>2</sub>), y ε 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.

### Variables de respuesta y análisis estadístico

Después del proceso fermentativo para la obtención de la bebida funcional, se realizó la cuantificación de las variables de respuesta (Tabla 2.) correspondientes a: kefirán, BAL, levaduras y diferencia de pH. Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la maximización de probióticos y prebióticos, se determinó las características nutricionales físico químicas y organolépticas de la bebida considerada como óptima. Las técnicas analíticas se realizaron como se describe en la tabla 3.

**Tabla 2.** Variables de respuesta

VARIABLES DE RESPUESTA		
Variable	Método	Unidad
Kefiran	Fenol-ácido sulfúrico (Dubois, 1956)	(µg/ml)
Bacterias ácido-lácticas	Siembras en MRS	UFC/ml
Levaduras	Siembras en YPD	UFC/ml
pH	Método potenciómetro	-----

**Tabla 3.** Variables de respuesta físico químicas, nutricionales y organolépticas

VARIABLES DE RESPUESTA			
	Variable	Unidad	Método
Físico químicas	Ácido láctico	% (m/m)	AOAC 947.5
	Viscosidad	Cp	AOAC 991.36
	Lactosa	% (m/m)	HPLC
	Grado alcohólico	°GL	CG
Nutricionales	Proteína	%	INEN 465
	Grasa	%	INEN 165
Análisis Sensorial	Textura	-	Degustación
	Olor	-	
	Sabor	-	
	Color	-	
	Aspecto	-	
	Aceptabilidad		

### Extracción del kefirán

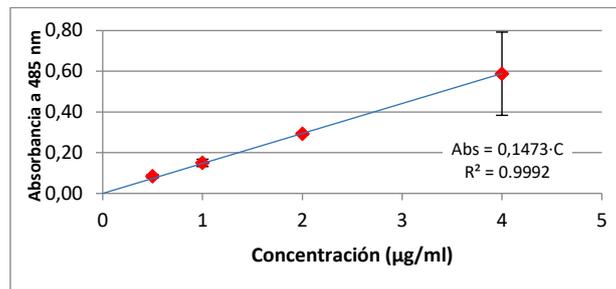
Una vez realizado la corroboración del óptimo kefirán mediante la repetición del proceso, se procedió a la extracción del kefirán. El proceso fue adaptado a la técnica analítica realizada por (Rimada & Abraham, 2001). La metodología consistió colocar 100 ml de alcohol absoluto en 100 ml del lactosuero 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 (MEMMERT INB 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.

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### Validación de la técnica analítica para la cuantificación del kefirán

En la Fig. 1, se puede observar que mantiene una linealidad hasta la concentración de 4 µg/ml de glucosa. 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  $Abs@485 \text{ nm} = 0.1473 \cdot C (\mu\text{g/ml})$  obtenida mediante los datos.



**Figura 1.** Curva de calibración de glucosa usada posteriormente para la cuantificación del kefirán.

Analizando los datos obtenidos se puede 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. Esta ecuación, fue usada para determinar la concentración de kefirán.

**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 concentración 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. Obteniendo los resultados presentados en la tabla 4.

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

$$K = 184.520 - 15.529 \cdot X_1 - 10.215 \cdot X_2 + 4.550 \cdot X_1 X_2 - 19.235 \cdot X_1^2 + 12.065 \cdot X_2^2$$

$$P = 3.038 + 0.109 \cdot X_1 - 0.019 \cdot X_2 - 0.017 \cdot X_1 X_2 - 0.076 \cdot X_1^2 - 0.058 \cdot X_2^2$$

$$\ln L = 19.578 + 1.009 \cdot X_1 + 0.323 \cdot X_2 - 0.512 \cdot X_1 X_2 - 0.784 \cdot X_1^2$$

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

Donde:

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

*P*: Reducción de pH, (-)

*L*: Concentración de BAL, (UFC/ml)

*Y*: Concentración de levaduras, (UFC/ml)

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

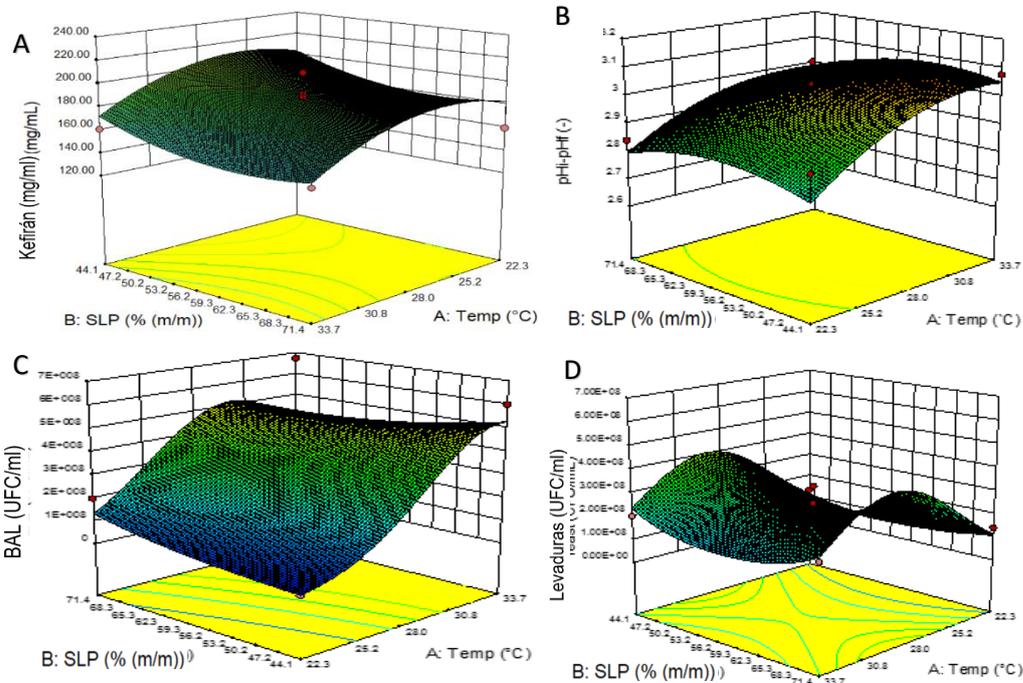
*X*<sub>2</sub>: Variable codificada del contenido de lactosuero en polvo.

La figura 2 muestra el comportamiento de cada variable con relación a los factores en estudio. En el caso de la concentración de kefirán, existe una máxima producción en rangos estimados de 23,0°C a 27,0 °C. y un contenido de SLP alrededor de 44,1%, e n los cuales se estima valores próximos a 180 mg Glu/ml. Estos valores mantienen 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.

Para la máxima concentración de BAL 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

**Tabla 4.** 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)		$-\Delta pH$ (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



**Figura 2.** 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) Concentración de BAL (UFC/ml); (D) Concentración de levaduras (UFC/ml).

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  $45^{\circ}\text{C}$  (Parra, 2010).

Referente a la concentración de levaduras se considera que su mayor concentración a temperaturas se encuentra en rangos de  $30.3$ - $30.7^{\circ}\text{C}$  en una concentración de SLP de  $44.1\%$

(m/m) y temperaturas de  $28.6$ - $29.1^{\circ}\text{C}$  en una concentración de  $71.4\%$  (m/m) de SLP.

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 de desarrollan (Erickson, Fayet, Kakumanu, & Lawrence, 2004).

**Optimización de los modelos sugeridos para encontrar los parámetros óptimos (temperatura y contenido de lactosuero en polvo) mediante la función de deseabilidad**

$$D = [K^{0,25} L^{0,25} P^{0,25} R^{0,25}]^{(1/(0,25+0,25+0,25+0,25))}$$

Mediante la función de deseabilidad aplicada a los modelos predichos se obtuvo parámetros óptimos (Tabla 5.) de temperatura de 29.3°C y contenido de SLP de 71.4%. Dichos parámetros maximizaron las variables de respuesta.

Para validar los parámetros óptimos que conforman la deseabilidad se realizó 6 repeticiones del bioproceso a esta condición, en el cual, se demostró que no existe diferencia

significativa entre los valores predichos y reales (Figura 3.).

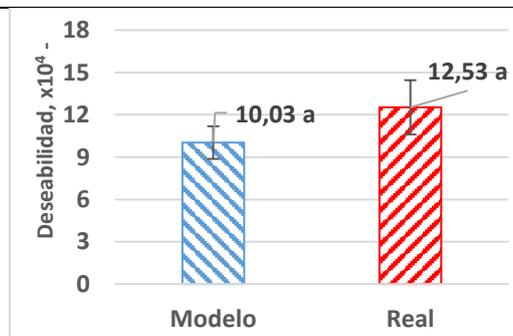
Estos valores óptimos de BAL de 9.74x108 UFC/ml y Levaduras de 4,53x108 UFC/ml son similares a otros resultados obtenidos mediante la fermentación de lactosuero con gránulos de kéfir mediante condiciones de fermentación similares (Sabokbar et al, 2015). Además, cumplen con los requerimientos acerca de la concentración de bacterias probióticas y levaduras de la NTE INEN 2395.

La concentración de kefirán 199.4 mg Glu/ml es superior al comparar con resultados de otras investigaciones similares que obtienen su máxima concentración de 61.72 mg Glu/ml (Sabokbar et al, 2015).

En el caso de la -ΔpH= 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).

**Tabla 5.** 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
<i>DE</i>	20.1	13.6	0.11	0.75	0.05	0.51	0.07	0.03	1.16	1.92



**Figura 3.** Experimentos de validación para el modelo de la deseabilidad obtenido mediante la optimización de los modelos de las variables de respuesta.

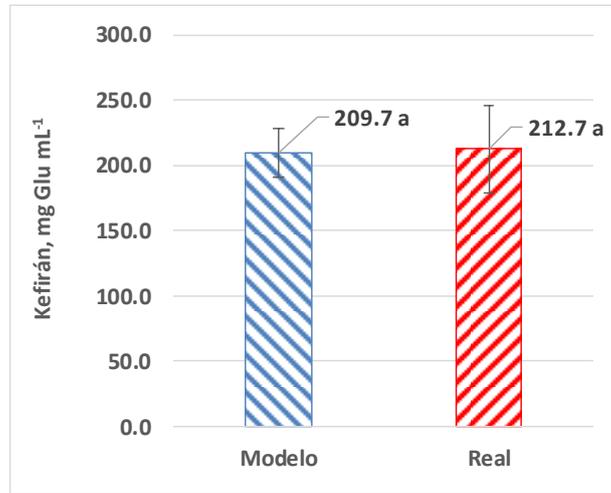
**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO SUGERIDO PARA LA CONCENTRACIÓN DE KEFIRÁN Y SU PROCESO DE EXTRACCIÓN.**

La máxima concentración de kefirán se obtuvo a 25°C y 44.1% (m/m) de SLP. Una vez obtenido los parámetros óptimos, se realizó la validación mediante 7 repeticiones del experimento obteniendo una concentración de

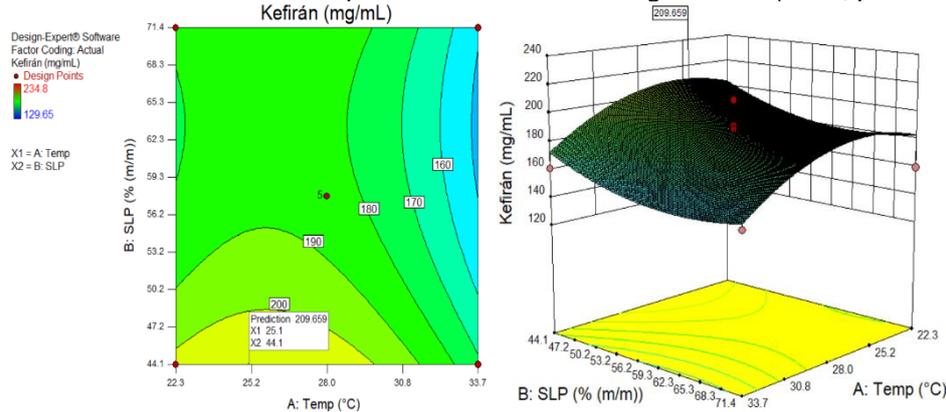
212.7 mg Glu/mL. Estos valores obtenidos no muestran diferencia significativa en relación con los valores predichos (Figura 4.). Otros autores reportan temperaturas óptimas a 25°C (Montesanto et al, 2016; Zajsek, Gorsek, & M, 2013), mientras que, otros autores reportaron valores cercanos. Por ejemplo, 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). En la figura 5, se muestra uno de los valores óptimos obtenidos de las variables

independientes que maximiza la concentración de kefirán.



**Figura 4.** 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 ( $n = 7, p < 0.05$ ).



**Figura 5.** Uno de los valores máximos sugeridos mediante la aplicación de optimización numérica para la concentración de kefirán.

### Evaluación de las características fisicoquímicas, nutricionales y sensoriales del producto obtenido

La tabla 6 muestra los resultados de las evaluaciones de las características nutricionales. En la cual, viscosidad del producto final tiene relación con la producción de kefirán y por la transferencia de los componentes de los gránulos de kefir durante la fermentación (Zolfi et al, 2014). El

contenido alcohólico de la bebida fue de 2.09 °GL, manteniéndose dentro de los rangos estimados de un kéfir fuerte, donde el límite máximo de alcohol es de 3.0 °GL (NTE INEN 2395), además el tiempo de fermentación es un importante en la producción de alcohol en bebidas, por lo cual, Assadi (2008) en su investigación muestra que un kéfir en una fermentación por 24 h alcanza un contenido de alcohol de 0.72 °GL.

El % de proteína se encuentra dentro de los niveles establecidos por NTE INEN 2609. Además, este nivel de proteína obtenido

concuera con el nivel de proteína de una fermentación de lactosuero con 3% de inóculo a 25°C (Assadi 2008). El contenido de grasa es similar al % obtenido en una fermentación de suero de leche con 3% de inóculo (Assadi 2008). La acidez se considera dentro de los

parámetros establecidos por la NTA ANDINA 16007 en la cual indica que un kéfir debe contener de 0.5 a 1.5% de ácido láctico. El SLP usado para esta fermentación tuvo un contenido inicial de 65% (m/v) de lactosa.

**Tabla 6.** Resultados de las evaluaciones de las características fisicoquímicas 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

Entonces, después del proceso fermentativo disminuyo aproximadamente en un 60% alcanzando un nivel de lactosa de 3.63% (m/v). Está disminución de lactosa es considerable, pero no suficiente para que el nivel final cumpla con los requerimientos de productos fermentados similares en referencia a la NTE INEN 2609. En estudios similares, la disminución de lactosa en un periodo de 40 h representa aproximadamente 40% (Sabokbar et al, 2015), el contenido final en un pH final 4.1 fue de 3.63 g/mL. Por lo cual la reducción de lactosa en una fermentación es proporcional al cambio de pH y al aumento de ácido láctico debido a la actividad de los m/o (Balabanova & Panayotov, 2011). Esta viscosidad es similar a la obtenida en otras investigaciones como resultado de una fermentación a 25°C (Sabokbar et al, 2015)

### Análisis sensorial

Los datos mostrados en la Figura 6 indican que la textura, su calificación obtenida por medio de los panelistas demostró que la bebida funcional es considerada como un producto fluido

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.

el sabor ácido es el que predomina; obteniendo una puntuación media de 6.7% en la escala creciente de intensidad de sabor.

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).

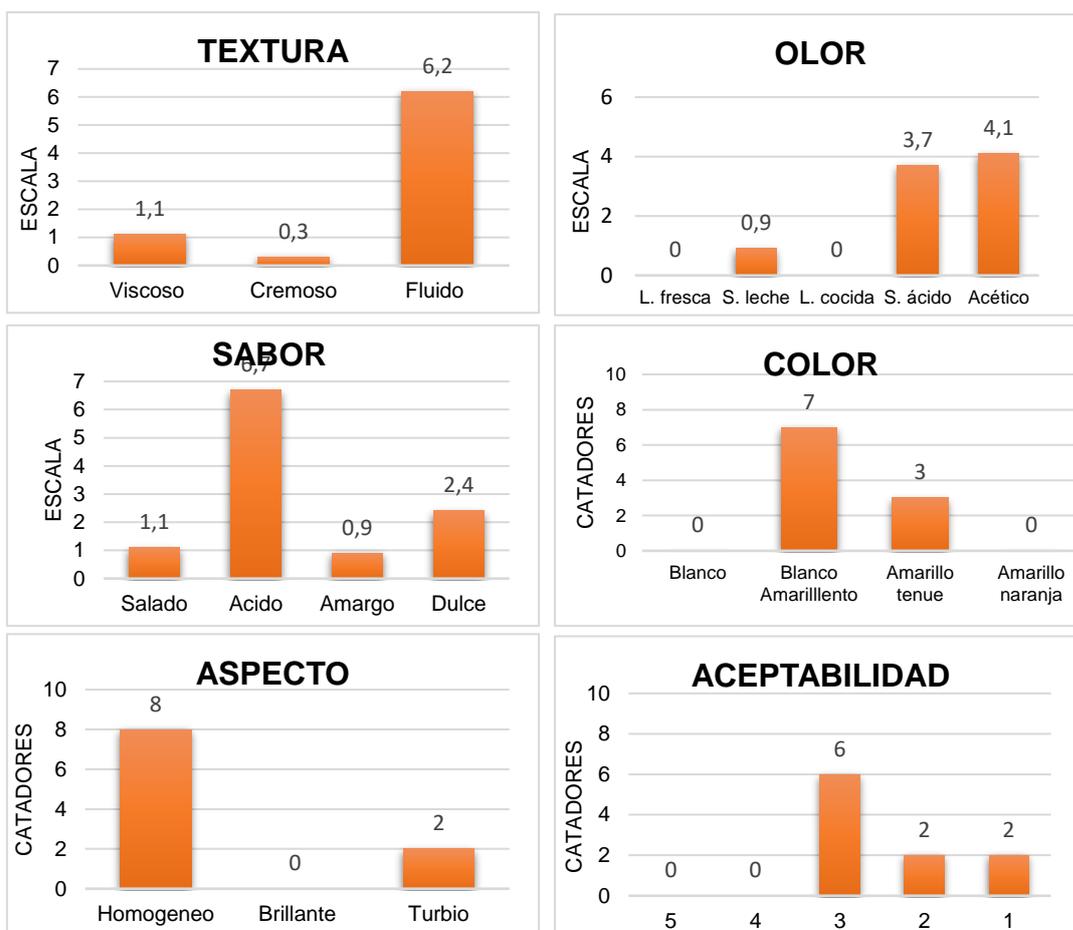
El color blanco amarillento de la bebida en la escala RGB corresponde a:

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.

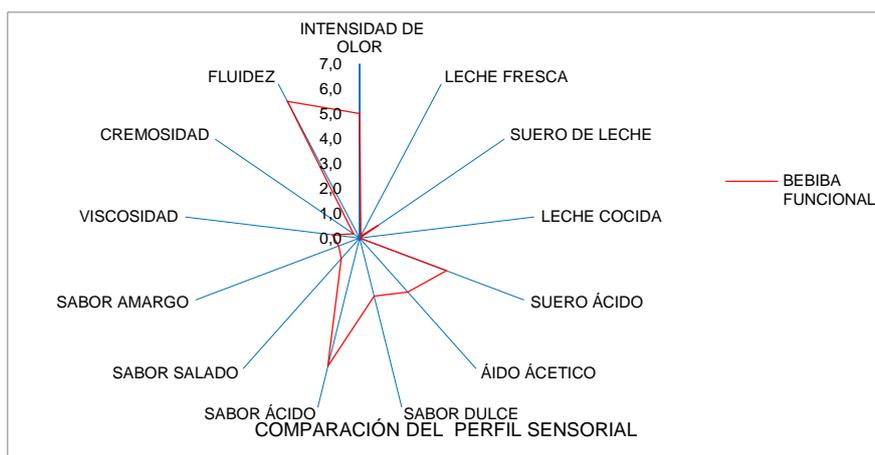
Los resultados muestran que la bebida funcional no tiene una buena aceptabilidad mediante sus características organolépticas. Esto puede ser debido a que la población no se encuentra familiarizada con las



**Figura 6.** Resultados del análisis sensorial (textura, olor, sabor, color, aspecto y aceptabilidad) de la bebida funcional realizada mediante los parámetros óptimos de deseabilidad.

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 tenga características organolépticas consideradas no tan agradables.



**Figura 7.** Representación gráfica del perfil sensorial de la bebida funcional

La Figura 7 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. Además 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.

## 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, BAL, 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, concentración 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 prebiótica.

## BIBLIOGRAFÍA

Assadi. (2008). Application of whey in fermented beverage production using kefir starter culture. *Nutrition & Food science*, 121-127.

- Balabanova, T., & Panayotov, P. (2011). Obtaining functional fermented beverages by using the kefir grains. *Procedia Food Science*, 1653-1659.
- 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.
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Jahanbin, K., Gharibzahedi, 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.
- Gutiérrez, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. Mexico D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Maeda, Hiroaki, Zhu, X., & Mitsuoka. (2003). New Medium for the Production of Exopolysaccharide (OSKC) by *Lactobacillus kefirianofaciens*. *Bioscience and Microflora*, 45-50.
- 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.
- Parra, R. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Revista Bio-Agro*, 93-105.
- Rimada, P., & Abraham, A. (2001). Polysaccharide production by kefir during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 653-661.
- 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.
- Zajsek, K., Gorsek, A., & M, K. (2013). Cultivating Conditions Effects on Kefiran Production by the Mixed Culture of Lactic Acid Bacteria Embedded within Kefir Grains. *Food Chemistry*, 970-977.
- Zolfi, M. K., Mousavi, M., & Hashemi, M. (2014). Development and characterization of the kefir-whey protein isolate-TiO<sub>2</sub> nanocomposite films. *Biological Macromolecules*, 340-345. Recuperado el 18 de 09 de 2016