



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**“OBTENCIÓN DE KEFIRÁN A PARTIR DE SUERO Y
GRÁNULOS DE KÉFIR”**

**Trabajo de titulación previo para la obtención del título de Ingeniera
Agroindustrial**

Autor: Lorena Dominique Carrera Acosta

Director: Ing. José Manuel Pais Chanfrau, PhD

Ibarra - Ecuador

2019



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

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

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**“OBTENCIÓN DE KEFIRÁN A PARTIR DE SUERO Y GRÁNULOS DE
KÉFIR”**

Tesis revisada por 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

.....


Ing. Jimmy Nuñez, MSc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL


.....


Ing. Marco Lara, MSc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL


.....

Lic. Ima Sánchez, MSc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL


.....



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

1. 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:

DATOS DE CONTACTO

CÉDULA DE IDENTIDAD: 100335190-3

APELLIDOS Y NOMBRES: Carrera Acosta Lorena Dominique

DIRECCIÓN: Av. Atahualpa 17-62 y Emilio Grijalva

EMAIL: domi_0693@hotmail.com

TELÉFONO MÓVIL 0998103915

DATOS DE LA OBRA

TÍTULO: “OBTENCIÓN DE KEFIRÁN A PARTIR DE SUERO Y GRÁNULOS DE KÉFIR”

AUTOR: Carrera Acosta Lorena Dominique

FECHA: 2019-02-22

PROGRAMA: X PREGRADO POSGRADO

TÍTULO POR EL QUE OPTA: Ingeniera Agroindustrial

DIRECTOR: Ing. José Manuel Pais Chanfrau, PhD

2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, Lorena Dominique Carrera Acosta, con cédula de identidad número 100335190-3, en calidad de autor 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 Universitaria con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y con apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

3. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, 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 Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 22 días del mes de febrero del 2019

Autor

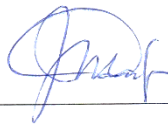


Lorena Dominique Carrera Acosta

C.C. 100335190-3

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Lorena Dominique Carrera Acosta, con cédula de ciudadanía N° 100335190-3 bajo mi supervisión.



Ing. José Manuel Pais Chanfrau, PhD

DIRECTOR DE TESIS



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

Yo, Lorena Dominique Carrera Acosta, con cédula de identidad Nro. 100335190-3, 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: **“OBTENCIÓN DE KEFIRÁN A PARTIR DE SUERO Y GRÁNULOS DE KÉFIR”**, que ha 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 22 días del mes de febrero del 2019

Autor

Lorena Dominique Carrera Acosta

C.C. 100335190-3

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 de terceros.

Ibarra, a los 22 días del mes de febrero del 2019

Autor



Lorena Dominique Carrera Acosta

C.C. 100335190-3

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme culminar una meta más en mi vida y ser mi fortaleza diaria.

A mis padres y hermano que siempre han sido mi apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida y son el eje fundamental de mi existir.

A mi director Ing. José Manuel Pais por su guía, sus enseñanzas y su paciencia durante todo este trabajo de investigación, a mis asesores por su apoyo y dedicación.

A mis queridos amigos por todas las experiencias compartidas y su cariño, que dejan hermosos recuerdos en mi corazón.

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico a dos personas que marcaron mi vida de manera muy significativa y que ahora son seres de luz y me cuidan desde el cielo, Gustavo, quien me enseñó a vivir el amor más bonito y puro y en especial, a mi querido hermano Augusto, a quien amaré infinitamente toda la vida y quien me enseñó a ser incondicional en todo momento, y estará siempre en mi corazón.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.0
SUMMARY	¡Error! Marcador no definido.1
CÁPITULO I.....	14
INTRODUCCIÓN	14
1.1. PROBLEMA	14
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	15
1.3. OBJETIVOS.....	16
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	16
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
1.4. HIPÓTESIS	16
1.4.1. HIPÓTESIS NULA.....	16
1.4.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	16
CÁPITULO II	17
MARCO TEÓRICO.....	17
2.1. LACTOSUERO.....	17
2.1.1. CLASIFICACIÓN DEL LACTOSUERO	17
2.1.2. COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO	18
2.1.3. LACTOSUERO COMO UN SUBPRODUCTO DE LA INDUSTRIA QUESERA	18
2.1.3. DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO) Y DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO) EN LA INDUSTRIA LÁCTEA.....	19
2.2. GRÁNULOS DE KÉFIR	22
2.2.1. LACTOSUERO FERMENTADO CON GRÁNULOS DE KÉFIR... ..	24
2.3. EXOPOLISACÁRIDOS (EPS).....	24
2.3.1. PROPIEDADES Y APLICACIONES.....	25
2.4. KEFIRÁN.....	26
2.4.1. PROPIEDADES DEL KEFIRÁN.....	26
2.4.2. APLICACIONES Y USOS DEL KEFIRÁN.....	27
CAPITULO III.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS	28

3.1	CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	28
3.1.1.	LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO	28
3.2.	MATERIALES Y EQUIPOS	28
3.2.1.	MATERIA PRIMA E INSUMOS	28
3.2.2.	EQUIPOS	29
3.2.3.	MATERIALES	29
3.3.	METODOLOGÍA.....	30
3.3.1.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE KEFIRÁN A PARTIR DE SUERO DE LECHE Y GRÁNULOS DE KÉFIR.....	30
3.3.2.	FACTORES EN ESTUDIO.....	30
3.3.3.	TRATAMIENTOS.....	31
3.3.4.	DISEÑO EXPERIMENTAL	32
3.3.5.	UNIDAD EXPERIMENTAL	33
3.4.	VARIABLES A EVALUAR.....	33
3.4.1.	VARIABLES CUANTITATIVAS	33
3.4.1.1.	Concentración de kefirán.....	33
3.5.	ELABORACIÓN DE FORMULACIONES PARA LOS TRATAMIENTOS PROPUESTOS.....	34
3.6.	ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE OBTENCIÓN DE KEFIRÁN A ESCALA DE LABORATORIO	36
3.6.1.	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE KEFIRÁN A ESCALA DE LABORATORIO	37
3.7.	DETERMINACIÓN DE LA CARGA CONTAMINANTE (DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO Y DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO) DE LOS EFLUENTES DEL PROCESO VERSUS EL VALOR DEL MATERIAL DE PARTIDA EN EL ESTUDIO.....	39
CAPITULO IV.....		40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		40
4.1.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE KEFIRÁN A PARTIR DE SUERO DE LECHE Y GRÁNULOS DE KÉFIR.	40
4.1.3.	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN	44

4.1.4. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL NUEVO DISEÑO EXPERIMENTAL	47
4.1.5. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA NUEVA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE KEFIRÁN.....	47
4.1.6. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN	49
4.1.7. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MOD≅ELO SUGERIDO PARA LA MAXIMIZACIÓN DE KEFIRÁN	50
4.1.8. REPRESENTACIONES GRÁFICAS DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE KEFIRÁN	51
4.2. ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE KEFIRÁN A ESCALA DE LABORATORIO.....	52
4.2.1. EXPERIMENTO DE FERMENTACIÓN A 48 Y 72 h; A 24°C Y 46%SL. 52	
4.2.2. EXPERIMENTO CON MUESTRA HOMOGENIZADA Y MUESTRA CON SOBRENADANTE PARA OBTENCIÓN DE KEFIRÁN, BAJO LAS CONDICIONES DE 24°C Y 46%SL.....	53
4.2.2.1. Espectro-barridos de los lavados de muestras homogenizadas y muestras con sobrenadante.....	55
4.3. DETERMINACIÓN DE LA CARGA CONTAMINANTE (DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO Y DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO) DE LOS EFLUENTES DEL PROCESO VERSUS EL VALOR DEL MATERIAL DE PARTIDA EN EL ESTUDIO.....	57
.....	60
4.3.1. ANÁLISIS DE LOS COSTOS DEL PROCESO DE OBTENCION DE KEFIRÁN A ESCALA DE LABORATORIO.....	61
CAPITULO V	64
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
5.1. CONCLUSIONES	64
5.2. RECOMENDACIONES	65
6. BIBLIOGRAFÍA.....	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del lactosuero dulce y ácido.....	18
Tabla 2. Bacterias encontradas en kéfir y granos de kéfir	23
Tabla 3. Levaduras encontradas en kéfir y en granos de kéfir.....	24
Tabla 4. Actividad biológica del kefirán.....	26
Tabla 5. Ubicación del área de estudio	28
Tabla 6. Factor A (Temperatura de incubación (°C)).	30
Tabla 7. Factor B (Contenido de suero de leche (%m/m))	31
Tabla 8. Descripción de tratamientos para la producción de kefirán a partir de suero de leche y gránulos de kéfir.....	31
Tabla 9. Grados Brix de las soluciones madre.....	35
Tabla 10. Formulaciones de los experimentos.....	36
Tabla 11. Concentraciones de glucosa (µg/ml).....	40
Tabla 12. ANOVA para el modelo de segundo orden de la concentración de kefirán (g Glu/ml) para la optimización de las condiciones de fermentación.....	45
Tabla 13. Condición óptima predicha y real para la maximización de la concentración de Kefirán	46
Tabla 14. ANOVA para el modelo cuadrático sugerido para la concentración de kefirán (g Glu/ml) en la optimización de las condiciones de fermentación.....	49
Tabla 15. Condiciones óptimas para la maximización de kefirán según el modelo sugerido.....	50
Tabla 16. Condición óptima predicha y real para la maximización de kefirán.....	51
Tabla 17. Experimento de fermentación a 48 y 72 h.	52
Tabla 18. Pesos obtenidos de cada experimento al final del proceso de muestra homogenizada y muestra con sobrenadante	54
Tabla 19 . DQO [kg/m ³] de los pool representativos de los experimentos y del material de partida.....	60
Tabla 20. Costos del proceso de obtención de kefirán por lote utilizando alcohol absoluto como solvente	62
Tabla 21. Costos del proceso de obtención de kefirán por lote utilizando alcohol técnico como solvente	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes del suero de la producción de quesos	20
Figura 2. Esquematación de los efluentes de suero de la producción de queso, resumen de los tratamientos convencionales y futuras soluciones.	21
Figura 3. Gránulos de kéfir	22
Figura 4. Representación gráfica de los tratamientos para la producción de kefirán	32
Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de obtención de kefirán	37
Figura 6. Curva de calibración de glucosa usada para la concentración del kefirán	41
Figura 7. Diagrama de proceso para la obtención del punto óptimo de la producción de kefirán.....	42
Figura 8. Plot de contorno de los valores de maximización sugeridos mediante la optimización numérica del modelo.	46
Figura 9. Plot de contorno de los valores de maximización sugeridos mediante la optimización numérica del modelo.	47
Figura 10. A) Plot de Contorno del punto óptimo de la maximización de kefirán; B) Representación gráfica 3D del punto óptimo para la maximización de kefirán	52
Figura 11. Representación gráfica de los rendimientos de muestras homogenizadas y con sobrenadante de alcohol técnico y alcohol absoluto.....	55
Figura 12. Espectro-barridos de muestra homogenizada y sobrenadante	56

RESUMEN

El principal subproducto de la industria láctea es el suero, éste retiene gran parte de los nutrientes de la leche y por lo tanto, puede ser empleado en la obtención de diversos productos de alto valor agregado. Es así que, el objetivo en este estudio fue obtener kefirán a partir de suero y gránulos de kéfir. Se tomó en cuenta las variables de temperatura de incubación (13.7, 17.0, 25.0, 33.0, 36.3 °C) y contenido de suero de leche (7.1%, 17.3%, 42%, 66.7%, 77%) para encontrar las condiciones que permitan la maximización de la concentración de kefirán mediante el uso de un diseño central compuesto. Se corroboró la validez de los modelos cuadráticos aplicándolos experimentalmente, por lo que se determinó que las mejores condiciones que permiten la maximización de kefirán son a una temperatura de 24°C y 46% m/m de contenido de suero, en el cuál se alcanzaron valores próximos a 177.5 g Glu/ml. Posteriormente, para establecer el proceso de obtención de kefirán se realizaron varios experimentos en los cuales se obtuvo que las mejores condiciones fueron a las 48 horas de fermentación, realizando los experimentos con muestra con sobrenadante y con el uso del alcohol técnico como solvente orgánico. Además, se realizó análisis de DQO a los experimentos y al material de partida que en este caso fue el suero y se demostró que, si existe diferencia significativa entre la muestra homogenizada del alcohol técnico con el resto de muestras lo que indica que es el experimento que tiene la mayor carga contaminante, pero entre las muestras homogenizadas y con sobrenadante no existió diferencia significativa con un intervalo de confianza del 95%. Y mediante 3 experimentos adicionales de 200ml de caldo de cultivo con las mejores condiciones, se logró un rendimiento de producción de kefirán de 5.18 ± 0.40 g/l.

Palabras clave: Kefirán, suero de leche, gránulos de kéfir, diseño central compuesto.

SUMMARY

The main product of the dairy industry is whey, it retains a lot of the nutrients of milk and therefore can be used to obtain various products with high added value. Thus, the objective in this study was to obtain kefir from whey and kefir granules. The variables of incubation temperature (13.7, 17.0, 25.0, 33.0, 36.3 °C) and whey content (7.1, 17.3, 42, 66.7 y 77% (m/m)) were taken into account in order to find the conditions that allow the maximization of kefir concentration through the use of a central composite design. The validity of the quadratic models was corroborated applying them experimentally, reason why it was determined that the best conditions that allow the maximization of kefir are at a temperature of 23.9 °C and 46% (m/m) of whey content, in which they were reached values close to 177.5 g Glu/ml. Later, to establish the process of obtaining kefir, several experiments were carried out in which it was obtained that the best conditions were after 48 h of fermentation, performing the experiments with sample with supernatant and with the use of technical alcohol as an organic solvent. In addition, COD analysis was performed on the experiments and the starting material, which in this case was the whey, and it was shown that, if there is a significant difference between the homogenized sample of technical alcohol and the rest of the samples, this indicates that it is the experiment which has the highest contaminant load, but between the homogenized and supernatant samples there was no significant difference with a 95% confidence interval. And through 3 additional experiments of 200 ml of culture broth with the best conditions, a production yield of kefir of 5.18 ± 0.40 g/l was achieved.

Key words: kefir, whey, kefir granules, central composite design.

CÁPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. PROBLEMA

En Ecuador, una de las principales actividades es la producción y comercialización de leche y sus derivados. Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC] (2017), se contabilizó una producción total diaria de 5.60 millones de litros de leche, de los cuales, aproximadamente 806 mil litros son destinados a la producción de quesos, lo cual representa un 31%.

El principal subproducto de la industria quesera es el suero y presenta alrededor del 85-95% del volumen total de la leche usada en esta producción. Éste retiene gran parte de los nutrientes contenidos en la leche, tales como, lactosa, proteínas solubles, lípidos, minerales, vitaminas y ácidos orgánicos (Mazaheri, Abdolmaleki y Mokarrame, 2008). Alrededor del 50% total de suero se envía a las plantas de tratamiento de aguas residuales, el 40% se emplea en la alimentación animal, mientras que solamente un 10% se destina a otros usos (Koutinas, Menelaou y Nicolaou, 2014), y debido a que las regulaciones medioambientales les exigen a los productores el tratamiento previo del suero antes de su vertimiento, dicho proceso genera costos extras en la industria reduciendo así su rentabilidad.

En este contexto, debido a que sólo una mínima cantidad del suero se transforma y éste aún retiene en su composición gran parte de los nutrientes valiosos de la leche,

puede ser empleado en la obtención de diversos productos útiles (Pescuma, de Valdez y Mozzi, 2015). Una alternativa para aprovechar el suero de la producción quesera, es mediante la maximización de kefirán. Sin embargo, no se ha logrado establecer un proceso adecuado para la producción a escala de este producto.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Alrededor de 110-115 millones de toneladas métricas de lactosuero son producidas a nivel mundial a través de la elaboración de queso (Londoño, 2006); es por eso que en la actualidad en diversos países, se ha conseguido ver al lactosuero no como un subproducto de desecho sino también como una alternativa para crear otros productos de alto valor agregado .

El kéfir es una bebida viscosa y ligeramente carbonatada, producida por los gránulos de kéfir que son un consorcio de bacterias ácido lácticas y levaduras que sobreviven en una matriz gelosa llamada kefirán (Patel y Prajapati, 2013); siendo este un exopolisacárido compuesto por proporciones iguales de glucosa y galactosa, ampliamente utilizado en forma de aditivo como espesante, estabilizador, emulsionante, sustitutivo de grasa y gelificante y también exhibe propiedades antibacterianas, anti-fúngicas y antitumorales (Welman y Maddox, 2003).

El propósito de esta investigación es ofrecer una alternativa al tratamiento convencional de un residual, en donde al utilizar el suero de leche junto con gránulos de kéfir se logre establecer una tecnología a escala de laboratorio para la obtención de kefirán.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener kefirán a partir de suero y gránulos de kéfir.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar las condiciones de fermentación para la producción de kefirán a partir de suero y gránulos de kéfir.
- Establecer un proceso de obtención de kefirán a escala de laboratorio.
- Determinar la carga contaminante (DQO [demanda química de oxígeno] y DBO [demanda bioquímica de oxígeno]) de los efluentes del proceso versus el valor de material de partida en el estudio.

1.4. HIPÓTESIS

1.4.1. HIPÓTESIS NULA

El contenido de suero y la variación de temperatura no influyen en el incremento de producción de kefirán.

1.4.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA

El contenido de suero y la variación de temperatura influyen en el incremento de producción de kefirán.

CÁPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. LACTOSUERO

El lactosuero o suero de leche es un producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración de queso, caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche pasteurizada y/o los productos derivados de la leche pasteurizada según el Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN] (2011).

El suero de leche es un subproducto de la industria quesera que presenta alrededor del 85-95% del volumen de la leche y contiene nutrientes tales como lactosa, proteínas solubles, lípidos, minerales, vitaminas y ácidos orgánicos debido a su alto contenido de materia orgánica. El contenido de suero de leche constituye un serio problema medioambiental, siendo la lactosa el principal responsable de los valores elevados de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) (Mazaheri et al., 2008).

2.1.1. CLASIFICACIÓN DEL LACTOSUERO

No todos los sueros son iguales, principalmente se diferencian por su composición, que depende de la leche para quesería, del contenido de humedad del queso, del pH al que el lactosuero se separa de la cuajada (Pescuma et al., 2015).

Según Jelen (2003) el lactosuero dulce está basado en la coagulación por la renina a pH 6.5. Mientras el lactosuero ácido resulta del proceso de fermentación o adición

de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos.

2.1.2. COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO

Según Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz (2014), la composición nutricional del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado en su elaboración, tal como se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Composición del lactosuero dulce y ácido

COMPONENTES	LACTOSUERO DULCE (g/l)	LACTOSUERO ÁCIDO (g/l)
Sólidos Totales	63.0 – 70.0	63.0 – 70.0
Lactosa	46.0 – 52.0	44.0 – 46.0
Proteína	6.0 – 10.0	6.0 – 8.0
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: Panesar, Kennedy, Gandhi y Bunko (2007)

2.1.3. LACTOSUERO COMO UN SUBPRODUCTO DE LA INDUSTRIA QUESERA

Las proteínas del suero son indiscutiblemente el componente de mayor importancia de el suero de leche, sus propiedades y aplicaciones son de gran interés en diversas áreas (Reis y Teixeira, 2011).

Está comprobado que la proteína del suero es un ingrediente alimenticio dinámico, capaz de desempeñar un papel fundamental en áreas de la salud tan diversas como la integridad y motilidad intestinal, funcionamiento y fortalecimiento del sistema inmunológico, cáncer, sistema cardiovascular, mejoría del desempeño cardiorrespiratorio y participación en el incremento del rendimiento deportivo (Reis y Teixeira, 2011).

Según Silva et al. (2009), algunas posibilidades de la utilización de este residuo han sido propuestas, pero las estadísticas indican que una importante porción del mismo es descartada como efluente, lo cual crea un serio problema ambiental.

2.1.3. DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO) Y DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO) EN LA INDUSTRIA LÁCTEA

La industria láctea se divide en varios sectores, que son asociados a la producción de aguas residuales contaminadas. Estos efluentes tienen diferentes características, según el producto obtenido (yogurt, queso, mantequilla, leche, helado, etc.) (Prazeres, Carvalho, y Rivas, 2012). La descarga de éstos sin tratamiento previo se convierte en un foco contaminante (Valencia y Ramirez, 2009), ya que alrededor del 50% de la producción total se deposita en plantas de tratamiento de aguas residuales o se utiliza para alimentación animal, mientras que sólo el 10% se transforma (Koutinas et al., 2014).

Según Carvalho, Prazeres, y Rivas (2013), las características de efluentes lácteos pueden variar significativamente, dependiendo de los productos finales, tipo de sistema y métodos de operación utilizados en la industria.

El suero es el residuo más contaminante generado en la producción de quesos, se puede referir que para la producción de 1 kg de queso, se necesitan alrededor de 10 kg de leche lo que origina unos 9 kg de suero (Prazeres et al., 2012).

Por otro lado, la DBO y la DQO se utilizan para determinar la cantidad de materia orgánica presente en los efluentes, la primera determina la cantidad de materia orgánica biodegradable y la segunda mide la cantidad total de materia orgánica (Valencia y Ramírez, 2009).

Entre los parámetros de estos desechos, los efluentes lácteos muestran una alta carga orgánica, de DBO₅ y DQO en el rango de 0.1-100 kg/m³. Los valores de DBO₅ y DQO son de 27-60 kg/m³ y 50-102 kg/m³, respectivamente (Prazeres et al., 2012), también se reportan valores de DQO en el intervalo 0.8-102 g/l y DBO en el rango 0.6-60 g/l (Carvalho et al., 2013).

Los efluentes de la producción de queso representan un impacto ambiental en la industria láctea debido a sus características fisicoquímicas, en las que se encuentran distintos componentes (Figura 1).

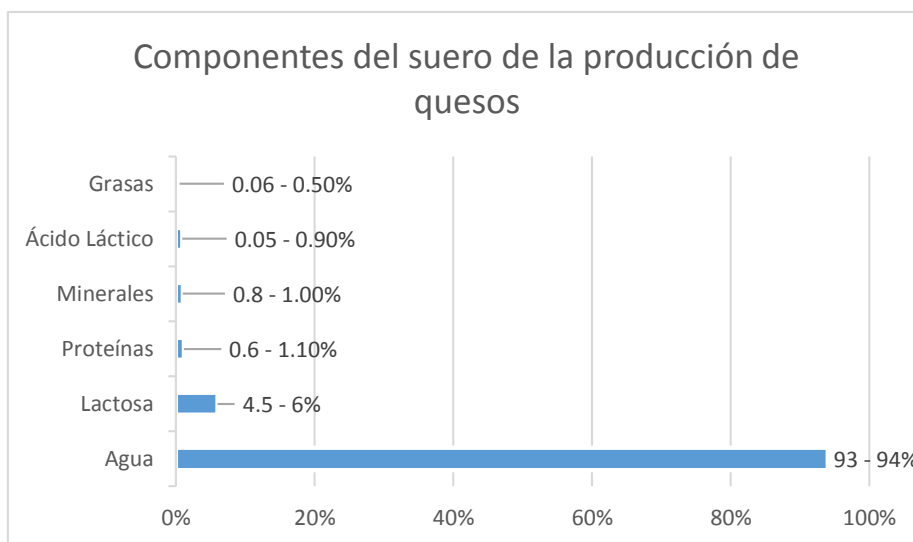


Figura 1. Componentes del suero de la producción de quesos

Fuente: Prazeres et al. (2012)

Además, la industria de fabricación de quesos es responsable de los tres principales tipos de efluentes; suero de queso (resultante de la producción de queso), segundo suero de queso (resultante de la producción de requesón) y el agua de lavado de las tuberías, el almacenamiento y los tanques que generan aguas residuales llamadas aguas residuales de suero de queso (agua de lavado que contiene diferentes fracciones de suero de queso o de segundo suero de queso).

Según Prazeres et al. (2012), existen tres opciones diferentes para la gestión de efluentes de la producción de queso que pueden ser considerados:

- La primera opción se basa en la aplicación de la valorización de tecnologías, lo que se introduce para recuperar compuestos valiosos tales como proteínas y lactosa.
- La segunda opción depende de la aplicación de tratamientos biológicos, por ejemplo, la hidrólisis de lactosa y proteínas conduce a la generación de los

monosacáridos de lactosa (glucosa y galactosa), péptidos o aminoácidos y la fermentación controlada que se está considerando en la producción de ácido láctico, ácido butírico, butanol, ácido acético, glicerol, acetona, etanol, etc.

- La tercera opción es la aplicación de tratamientos fisicoquímicos tales como floculación de coagulación, ozonización, “fenton”, precipitación térmica e isoelectrónica, precipitación termo-cálcica, precipitación ácida, precipitación alcalina, oxidación electroquímica, etc.

En la figura 2, se puede apreciar la esquematización de los efluentes de la producción de queso con respecto a sus tratamientos convencionales y futuras soluciones.

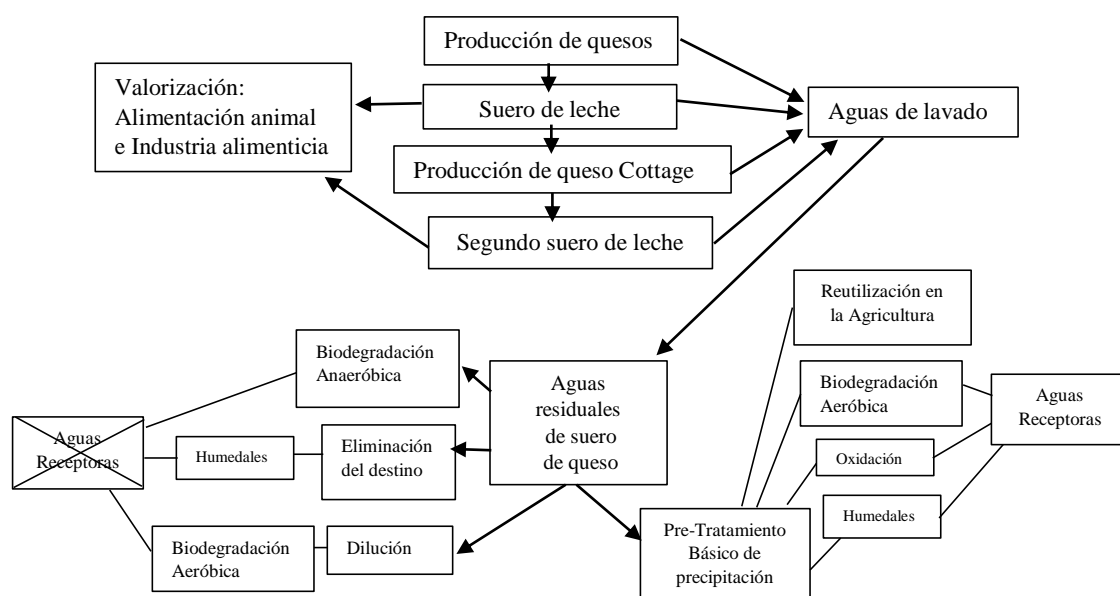


Figura 2. Esquematización de los efluentes de suero de la producción de queso, resumen de los tratamientos convencionales y futuras soluciones.

Fuente: Carvalho et al. (2013)

Por estas razones es importante que las industrias lácteas utilicen el suero de leche en busca de nuevas aplicaciones de valor agregado, como por ejemplo productos obtenidos por fermentación microbiana (Pescuma et al., 2015).

2.2. GRÁNULOS DE KÉFIR

Los gránulos de kéfir son suaves, partículas gelatinosas e irregulares, compuestas de bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras que están rodeadas de proteínas, lípidos y una matriz de exopolisacárido llamado kefirán (Frengova, Simova, Beshkova y Simov, 2002) (Figura 3).



Figura 3. Gránulos de kéfir

Fuente: Contexto Ganadero (2015)

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son un grupo de bacterias anaerobias facultativas relacionadas, que producen ácido láctico como principal metabolito o único producto de fermentación; además contribuyen al sabor, aroma, textura y el valor nutricional de alimentos fermentados a través de la producción de exopolisacáridos (EPS) (Parra, 2010)

Según Magalhães et al. (2011) los granos de kéfir contienen:

- Bacterias ácido lácticas (BAL), incluyendo *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* spp.
- Levaduras como, *Kluyveromyces*, *Torula*, *Candida* y *Saccharomyces* spp.

Ejemplos de las bacterias encontradas en kéfir y los gránulos se pueden ver en la tabla 2; mientras que las levaduras se listan en la tabla 3.

Tabla 2. Bacterias encontradas en kéfir y granos de kéfir

BACTERIAS ENCONTRADAS EN KÉFIR Y GRANOS DE KÉFIR	
Lactobacilli	
<i>Lactobacillus kéfir</i>	<i>Lactobacillus delbrueki</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>
<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>
Lactococci	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremonis</i>	
Streptococci	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	
Enterococci	
<i>Enterococcus durans</i>	
Leuconostocs	
<i>Leuconostoc</i> sp.	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
Bacteria Ácido acética	
<i>Acetobacter</i> sp.	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
<i>Acetobacter aceti</i>	
Otras bacterias	
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.
<i>Bacillus subtilis</i> .	<i>Escherichia coli</i> .

Fuente: Farnworth (2005)

Tabla 3. Levaduras encontradas en kéfir y en granos de kéfir

LEVADURAS ENCONTRADAS EN KÉFIR Y EN GRANOS DE KÉFIR	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida friedrichii</i>
<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tenuis</i>
<i>Saccharomyces unisporus</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Candida maris</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>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Brettanomyces anormalus</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	<i>Pinchia fermentans</i>

Fuente: Farnworth (2005)

Las levaduras juegan un papel importante en la preparación de productos lácteos fermentados, donde pueden proporcionar nutrientes esenciales de crecimiento tales como aminoácidos y vitaminas, alterar el pH, secretar etanol y producir CO₂ (Viljoen, 2001).

2.2.1. LACTOSUERO FERMENTADO CON GRÁNULOS DE KÉFIR

Según Huertas (2009), la fermentación de suero por microorganismos de kéfir puede disminuir el alto contenido de lactosa en el suero de leche, produciendo principalmente ácido láctico y otros metabolitos que contribuyen al sabor y la textura y al aumento de la solubilidad y dulzura de los carbohidratos del producto final.

Existen varias propuestas para la valorización del lactosuero empleando gránulos de kéfir. Entre ellas podemos mencionar la producción de alcohol, polisacáridos, bebidas fermentadas, leudantes para panificación, *starters* para la producción de queso y proteínas celulares.

2.3. EXOPOLISACÁRIDOS (EPS)

Los exopolisacáridos (EPS) son producidos por las bacterias ácido lácticas y muestran buenas características fisicoquímicas para su uso como aditivos alimentarios. Además de estas características, los EPS se obtienen a partir de microorganismos clasificados como *GRAS* (generalmente reconocido como seguro), tales como las bacterias ácido lácticas (BAL) (Wang, Ahmed, Feng, Li y Song, 2008; Badel, Bernardi y Michaud, 2011).

Se ha informado que algunas cepas de BAL producen EPS y han ganado cada vez más atención en los últimos años debido a su contribución a la reología y textura de la leche fermentada y los productos alimenticios (Cerning, 1999); la mayor parte de BAL que producen EPS pertenece a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* y son capaces de producir principalmente dos tipos de polisacáridos de acuerdo a su ubicación en la célula: polisacáridos intracelulares y polisacáridos extracelulares (Degeest, Vaningelgem y De Vuyst, 2001).

2.3.1. PROPIEDADES Y APLICACIONES

Los EPS tienen propiedades fisicoquímicas y reológicas que constituyen adecuadores, que pueden ser estabilizantes, emulsionantes, gelificantes y mejoradores de la viscosidad. Además, los EPS son sustancias bioactivas que aportan sus efectos como antioxidantes, antitumorales, agentes antimicrobianos e inmunomoduladores, entre otras funciones (Piermaria et al., 2011; Prado et al., 2015)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) están asociadas con muchos alimentos fermentados; especialmente los productos lácteos como la cuajada, el yogur, la crema agria, el queso y el suero de leche, donde contribuyen a desarrollar el sabor y la vida útil de los alimentos fermentados (Shah, 2013), algunos de los EPS producidos por BAL son los "bio espesantes", que ofrecen un enfoque natural, más aceptable y preferido para muchos aditivos. Estos cultivos satisfacen las necesidades de los consumidores para productos con bajos niveles de aditivos químicos, reducen la cantidad de sólidos totales requeridos sin afectar los atributos de textura y mejora las propiedades sensoriales (De Vuyst, De Vin, Vaningelgem y Degeest, 2001; Folkenberg, Dejmek, Skriver, Skov Guldager e Ipsen, 2006).

Las aplicaciones de EPS bacterianas abarcan áreas tales como la industria (textil, lácteos, cosméticos, etc.), salud y medio ambiente (remediación, floculación, etc.); la búsqueda de cepas de alta producción de EPS es un proceso continuo, y se debe trabajar en la optimización de las condiciones de fermentación, las herramientas biotecnológicas que implican ingeniería genética, así como la exploración de sustratos de fermentación baratos para su producción para mejorar la producción de

los EPS a escala comercial y su aplicación en el campo (Patel y Prajapati, 2013).

2.4. KEFIRÁN

El kefirán es un EPS clasificado como un heteropolisacárido que comprende glucosa y galactosa en altas concentraciones, es producido principalmente por *Lactobacillus kefiranofaciens*, y se clasifica como un glucogalactano soluble en agua, lo que hace que sea adecuado para ser usado como aditivo (Wang et al., 2008; Zajšek, Kolar y Goršek, 2011).

2.4.1. PROPIEDADES DEL KEFIRÁN

Según Prado et al. (2015) se ha demostrado que el kefirán mejora la viscosidad y las propiedades viscoelásticas de los geles de leche ácidos; y es capaz de formar geles que tienen propiedades interesantes a bajas temperaturas (Zajšek, Goršek y Kolar, 2013).

Además se observa que las propiedades reológicas son muy buenas y pueden mejorar significativamente el mantener las propiedades del gel y evitando la pérdida de agua durante el almacenamiento (Kök-Taş, Seydim, Özer y Guzel-Seydim, 2013) (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad biológica del kefirán

EXOPOLISACÁRIDO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
Kefirán	Reducción de la presión arterial inducida por la hipertensión Aumento de la actividad peritoneal IgA Actividad antitumoral Actividad antimicrobiana Modulación del sistema inmune intestinal y protección de las células epiteliales

Fuente: Prado et al. (2015)

2.4.2. APLICACIONES Y USOS DEL KEFIRÁN

Se puede utilizar kefirán en muchos campos aplicados tales como alimentos, cosméticos y las industrias farmacéuticas, además según Zajšek et al. (2011) este polímero es ampliamente utilizado como un aditivo en forma de:

- Espesante
- Estabilizador
- Emulsionante
- Sustitutivo de grasa
- Gelificante

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

3.1.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El proceso de desarrollo de esta investigación 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 (Tabla 5).

Tabla 5. Ubicación del área de estudio

Ubicación del área de estudio	
Provincia:	Imbabura
Cantón:	Ibarra
Parroquia:	Sagrario
Altitud:	2256 m.s.n.m.
Temperatura promedio:	19°C
HR promedio:	73%

Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) (2017)

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1. MATERIA PRIMA E INSUMOS

- Suero de leche
- Cultivo: Gránulos de kéfir
- Fosfato monobásico de potasio, K_2HPO_4

- Sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Sulfato de magnesio, MgSO_4
- Sacarosa, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$
- Agua Esterilizada, H_2O
- Alcohol absoluto, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
- Alcohol técnico, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

3.2.2. EQUIPOS

- Agitador recíprocante termostataado MRC (modelo WTB-200)
- Balanza gramera OHAUS (modelo AX1502/E)
- pH-metro
- Espectrofotómetro Jenway UV/Vis (modelo 6705 UV/Vis)
- Equipo de refrigeración
- Autoclave
- Centrifuga refrigerada Sorvall (modelo ST 16 Centrifuge)
- Vortex Mixer (modelo #500, Globe Scientifics)
- Agitador Magnético Bio Magnetic Stirrer (modelo MMS-300, BOECO)
- Estufa Memmert (modelo 5NB-400)

3.2.3. MATERIALES

- Erlenmeyer
- Vasos de precipitación
- Frascos
- Micropipetas
- Gradillas
- Tubos Eppendorff
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcon
- Paletas metálicas
- Probeta

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE KEFIRÁN A PARTIR DE SUERO DE LECHE Y GRÁNULOS DE KÉFIR

Para determinar las condiciones óptimas de fermentación, se realizó la cuantificación de la concentración de kefirán, además de bacterias ácido lácticas, de levaduras y medición de pH a cada uno de los tratamientos propuestos a continuación. Previamente se realizó una curva de calibración a distintas concentraciones de glucosa: 10, 5, 2.5, 1.25 µg/ml, usando la técnica analítica fenol-ácido sulfúrico (Dubois, Gilles, Rebers y Smith, 1956), para la determinación de azúcares y sustancias relacionadas; con el fin de que los valores obtenidos en la concentración de kefirán se encuentren dentro del rango establecido por dicha curva.

A continuación, se describe el diseño experimental que se utilizó para la optimización de las condiciones de fermentación para la producción de kefirán.

3.3.2. FACTORES EN ESTUDIO

Los factores en estudio propuestos para la presente investigación están dados por la temperatura (Tabla 6) y el contenido de suero de leche (Tabla 7):

Tabla 6. Factor A (Temperatura de incubación (°C)).

Simbología	Temperatura (°C)
A1	13.7
A2	17.0
A3	25.0
A4	33.0
A5	36.3

Tabla 7. Factor B (Contenido de suero de leche (%m/m))

Simbología	% SL(%m/m)
B1	7.1%
B2	17.3%
B3	42%
B4	66.7%
B5	77%

3.3.3. TRATAMIENTOS

Para esta investigación en el diseño experimental se obtuvieron 20 tratamientos, con cuatro repeticiones al punto central y dos repeticiones para todos los puntos axiales, para una mejor apreciación del análisis estadístico se establecieron variables codificadas a razón de -1.414, -1.000, 0.000, +1.000, +1.414. (tabla 8) y además se puede observar la representación gráfica de los tratamientos en la figura 4.

Tabla 8. Descripción de tratamientos para la producción de kefirán a partir de suero de leche y gránulos de kéfir.

Tratamientos	Variables codificadas		Variables reales	
	Factor A	Factor B	Factor A: Temperatura (°C)	Factor B: %SL (%m/m)
1	-1.414	0.000	13.7	42.0
2	-1.414	0.000	13.7	42.0
3	-1.000	-1.000	17.0	17.3
4	-1.000	-1.000	17.0	17.3
5	-1.000	+1.000	17.0	66.7
6	-1.000	+1.000	17.0	66.7
7	0.000	-1.414	25.0	7.1
8	0.000	-1.414	25.0	7.1
9	0.000	0.000	25.0	42.0
10	0.000	0.000	25.0	42.0
11	0.000	0.000	25.0	42.0
12	0.000	0.000	25.0	42.0
13	0.000	+1.414	25.0	77.0
14	0.000	+1.414	25.0	77.0
15	+1.000	-1.000	33.0	17.3
16	+1.000	-1.000	33.0	17.3
17	+1.000	+1.000	33.0	66.7
18	+1.000	+1.000	33.0	66.7
19	+1.414	0.000	36.3	42.0
20	+1.414	0.000	36.3	42.0

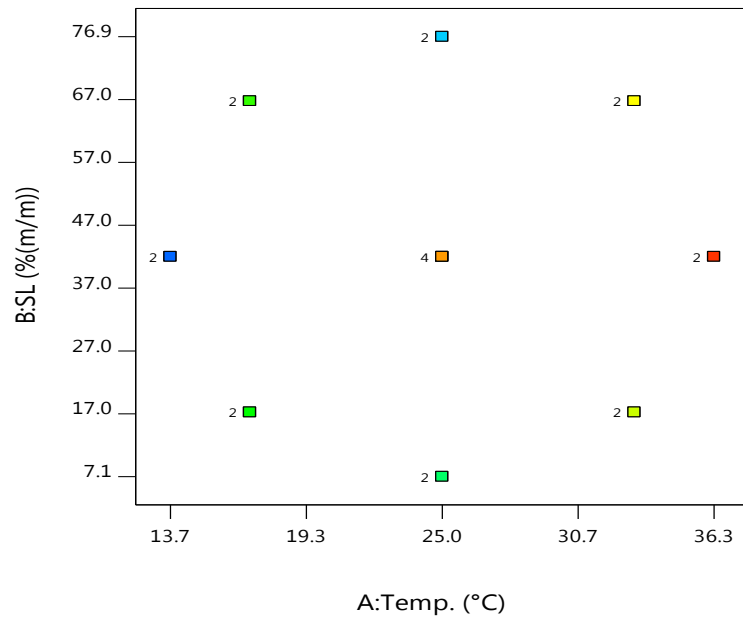


Figura 4. Representación gráfica de los tratamientos para la producción de kefirán

3.3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

La optimización de las condiciones de fermentación se realizó mediante combinaciones de dos factores: temperatura de incubación (13.7 - 36.3°C) y contenido de suero de leche (7.0 – 77.0%) (tabla 8) para la maximización de la producción de kefirán.

Veinte tratamientos aleatorizados fueron propuestos para lo cual se utilizó un Diseño Compuesto Central mediante el empleo del paquete estadístico *Design Expert 10.0*.

La correlación entre las variables independientes y la variable dependiente fueron expresadas en función de un modelo estadístico cuadrático:

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

Donde:

FK : variable de respuesta de la concentración de kefirán (g Glu/ml),

X_i : Factor A (Temperatura de incubación (°C));

X_j : Factor B (Contenido de suero de leche (%));

β_0 : es el coeficiente constante;

β_i : representa el efecto del factor X_i (temperatura de incubación);

β_j : representa el efecto del factor X_j (contenido de suero de leche);

β_{ij} : efecto de la interacción entre los factores X_i y X_j ;

ε : componente del error aleatorio del modelo.

3.3.5. UNIDAD EXPERIMENTAL

Cada unidad experimental estará constituida de 100 g de muestra.

3.4. VARIABLES A EVALUAR

3.4.1. VARIABLES CUANTITATIVAS

Para los tratamientos propuestos se evaluó la concentración de kefirán con el objetivo de encontrar un modelo que pueda ser utilizado para maximizar la producción de éste. Además de la cuantificación de bacterias ácido-lácticas y levaduras, se midió el pH a todos los tratamientos, con el fin de comprobar que se haya dado el proceso de fermentación correctamente.

Las técnicas analíticas para cada una de las variables fueron realizadas mediante las metodologías descritas a continuación:

3.4.1.1. Concentración de kefirán

La concentración de kefirán se determinó mediante el procedimiento presentado por Sabokbar, Moosavi-Nasab y Khodaiyan (2015), para ello se utilizaron 5 ml de la muestra y 5 ml de alcohol absoluto para la precipitación del kefirán en una centrifuga refrigerada (Sorvall ST 16 Centrifuge) a 4°C por 45 min a 2000 xg. El resultante de

la precipitación fue redisolto con 10 ml de agua destilada y llevado nuevamente a centrifugación a 4°C por 45 min a 2000 rpm, este procedimiento se realizó 2 veces más, bajo las mismas condiciones.

El sobrenadante de la última centrifugación fue resuspendido y de éste se tomó 1 ml de muestra la cual fue cuantificada usando la técnica analítica fenol-ácido sulfúrico presentado por Dubois et al. (1956). La absorbancia fue medida a 485 nm usando un espectrofotómetro UV/Visible (modelo 6705 UV/Vis). La concentración fue calculada con base en una curva patrón de glucosa que fue previamente realizada, con el fin de que los resultados de las lecturas de todos los tratamientos se encuentren dentro de los rangos establecidos, estos resultados fueron expresados en µg de glucosa/ml de muestra.

3.4.1.2. Cuantificación de bacterias ácido lácticas y levaduras

La cuantificación de bacterias ácido lácticas y levaduras se determinó mediante un conteo en placa, se utilizó un medio de cultivo Man, Rogosa and Sharpe (MRS) para las bacterias ácido lácticas y un medio de cultivo Yeast Potato Dextrosa (YPD) para levaduras. Se tomó 1 ml de muestra y se realizaron diluciones de 10^6 y 10^7 para los dos medios de cultivo, luego fueron incubados a una temperatura de 30°C por 48h. Los resultados fueron expresados en UFC/ml.

3.4.1.3. Medición de pH

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

3.5. ELABORACIÓN DE FORMULACIONES PARA LOS TRATAMIENTOS PROPUESTOS

Se elaboraron distintas formulaciones para cada uno de los tratamientos de acuerdo a las concentraciones de suero de leche que fueron sugeridas en el diseño experimental, se tomó en consideración para todos los tratamientos 14° Brix como óptimo, de acuerdo como sugiere Sabokbar et al. (2015).

Cada formulación está constituida por soluciones madre de suero de leche al 7.2% (m/v), sacarosa al 88% (m/v), una solución de sales a 10X como se recomienda en Kilic, Demirhan, Ozel y Ozbek (2015), la cual está constituida por KH_2PO_4 al 1% (m/v), MgSO_4 al 5% (m/v) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 1% (m/v). Con el propósito de que cada muestra empiece bajo los mismos parámetros, a cada una de éstas soluciones madre se les midió los grados Brix, tal como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Grados Brix de las soluciones madre.

	SOLUCIONES MADRE	°BRIX
m₁	Suero de leche	7.2%
m₂	Sol. Sales a 10X	1.2%
m₃	Sacarosa al 88%	74.4%
m₄	Agua Destilada	0.0%

Tomando en cuenta estos datos, se realizaron las formulaciones de tal manera que se demostró que el ° Brix de una mezcla es equivalente a la sumatoria ponderada de los de cada solución, como se muestra en la siguiente ecuación:

$${}^{\circ}\text{Brix}_M = \frac{(m_1 \cdot {}^{\circ}\text{Brix}_1) + (m_2 \cdot {}^{\circ}\text{Brix}_2) + (m_3 \cdot {}^{\circ}\text{Brix}_3) + (m_4 \cdot {}^{\circ}\text{Brix}_4)}{m_1 + m_2 + m_3 + m_4} \quad [2]$$

A continuación, se muestra las formulaciones que se utilizaron en los experimentos (tabla 10).

Tabla 10. Formulaciones de los experimentos.

PUNTO NEGATIVO					PUNTO POSITIVO				
		%	Masa(g)	%Brix			%	Masa(g)	%Brix
Suero	m1	6.8	7.0	7.2%	Suero	m1	74.3	77.0	7.2%
Sol. Sales	m2	9.6	10.0	1.2%	Sol. Sales	m2	9.6	10.0	1.2%
Sac. 88%	m3	17.3	18.0	74.4%	Sac. 88%	m3	10.7	11.1	74.4%
H₂O	m4	62.7	65.0	0.0%	H₂O	m4	1.8	2.0	0.0%
			100.0	14.0%				100.0	14.0%
Inóculo		3.6	3.7		Inóculo		3.6	3.7	
Total		100.0	103.7		Total		100.0	103.7	

PUNTO MENOR					PUNTO MAYOR				
		%	Masa(g)	%Brix			%	Masa(g)	%Brix
Suero	m1	16.6	17.3	7.2%	Suero	m1	64.3	66.70	7.2%
Sol. Sales	m2	9.6	10.0	1.2%	Sol. Sales	m2	9.6	10.0	1.2%
Sac. 88%	m3	16.4	17.0	74.4%	Sac. 88%	m3	11.8	12.2	74.4%
H₂O	m4	53.7	55.7	0.0%	H₂O	m4	10.7	11.1	0.0%
			100.0	14.0%				100.0	14.0%
Inóculo		3.6	3.7		Inóculo		3.6	3.7	
Total		100.0	103.7		Total		100.0	103.7	

PUNTO CENTRAL				
		%	Masa(g)	%Brix
Suero	m1	40.5	42.0	7.2%
Sol. Sales	m2	9.6	10.0	1.2%
Sac. 88%	m3	14.1	14.6	74.4%
H₂O	m4	32.2	33.4	0.0%
			100.0	14.0%
Inóculo		3.6	3.7	
Total		100.0	103.7	

3.6. ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE OBTENCIÓN DE KEFIRÁN A ESCALA DE LABORATORIO

Para establecer el proceso de obtención de kefirán a escala de laboratorio en primer lugar, se procedió a corroborar el punto óptimo de la concentración máxima de kefirán mediante la repetición del experimento. Se continuó con el proceso de obtención de kefirán adaptando la técnica analítica que fue realizada por Rimada y Abraham (2001), explicada a continuación en el manejo específico del experimento (figura 5).

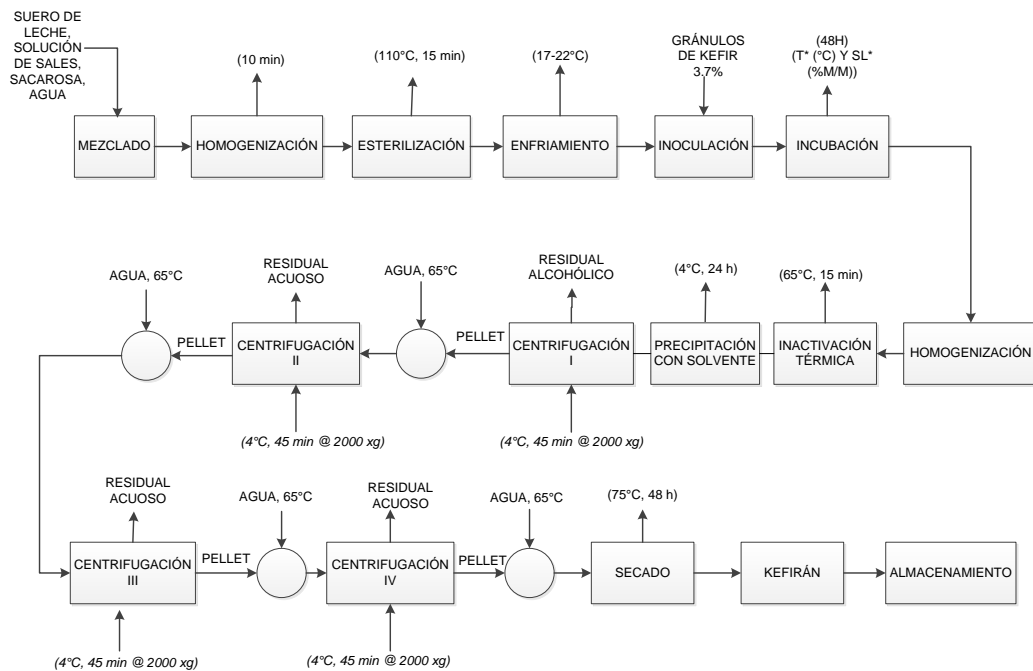


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de obtención de kefirán

3.6.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE KEFIRÁN A ESCALA DE LABORATORIO

Mezclado

En este proceso se mezclarán todos los componentes para la obtención de kefirán, acorde a la formulación tal como se describió anteriormente.

Homogenización

Los 100g de la mezcla fue homogenizada con la ayuda de un agitador magnético Bio Magnetic Stirrer (modelo MMS-300, BOECO) por un período de 10 min.

Esterilización.

La mezcla fue llevada a esterilización a 110 °C por 10 min.

Enfriamiento

Después fue enfriada hasta temperatura ambiente.

Inoculación

La inoculación se realizó utilizando balanza analítica y azas metálicas, se tomó 3.7 g de cultivo (gránulo de kéfir) y fue inoculado directamente hacia el Erlenmeyer que contiene la mezcla. Las azas metálicas, fueron previamente esterilizadas.

Incubación

Mediante el uso de un agitador recíprocante termostataado MRC (modelo WTB-200) la mezcla fue llevada a incubación por 48 h a 100 rpm y bajo las condiciones óptimas de temperatura de incubación (T^* (°C)) y contenido de suero de leche (%SL* (%m/m)) sugeridas por el diseño.

Homogenización

Se sometió la mezcla a un proceso de homogenización mediante el uso de una licuadora durante 10 min, de esta manera se obtuvieron partículas más pequeñas.

Inactivación térmica

Se procedió a colocar la mezcla a 65°C por aproximadamente 15 min, lo que provocó una inactivación de las enzimas que se liberan en la mezcla.

Precipitación con solvente orgánico

Se usó 100 ml de la mezcla y 100 ml de alcohol técnico para la precipitación del kefirán y se lo dejó en refrigeración a 4°C durante 24 h.

Centrifugación I, II, III, IV

Se llevó a la muestra a centrifugación a 4°C por 45 min a 2000 xg en una centrífuga refrigerada Sorvall (modelo ST 16 Centrifuge), el sobrenadante fue retirado y al

residual sólido (*pellet*) se le colocó 10 ml de agua destilada a 70 °C y se lo re-disolvió con un vortex Mixer (modelo #500, Globe Scientifics), y se luego se lo llevó nuevamente a centrifugación bajo las mismas condiciones. Este procedimiento se realizó tres veces más, con el fin de obtener un *pellet* limpio.

Secado

El último precipitado obtenido tras la centrifugación fue pesado y se lo llevó a secar en una estufa Memmert (modelo 5NB-400) a 75°C por 48 h hasta que se verificó que no exista diferencia en el peso de la materia seca.

Kefirán

El producto obtenido después del secado fue el kefirán, al cual se lo pesó y se lo expresa en g/l.

Almacenamiento

El kefirán fue almacenado en un recipiente de plástico sellado y conservado a temperatura ambiente.

3.7. DETERMINACIÓN DE LA CARGA CONTAMINANTE (DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO Y DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO) DE LOS EFLUENTES DEL PROCESO VERSUS EL VALOR DEL MATERIAL DE PARTIDA EN EL ESTUDIO.

Para la determinación de la carga contaminante de los efluentes del proceso versus el valor del material de partida en el estudio, se realizaron análisis de DBO₅ y DQO al pool de los efluentes, es decir a los volúmenes de los sobrenadantes resultantes de cada una de las centrifugaciones (Centrifugación I, II, III, IV) (Figura 5) y del material de partida (suero de leche). Los análisis de DQO fueron realizados mediante las técnicas analíticas del método HACH 8000 en un laboratorio certificado.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE KEFIRÁN A PARTIR DE SUERO DE LECHE Y GRÁNULOS DE KÉFIR.

4.1.1. CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE KEFIRÁN

Para la optimización de las condiciones de fermentación para la producción de kefirán, se realizó en primer lugar una curva patrón de glucosa la cual fue usada posteriormente para la cuantificación de kefirán. Ésta curva patrón se realizó según el método de Dubois et al. (1956), para la determinación de azúcares y sustancias relacionadas, se la realizó a través de espectrofotometría a una longitud de onda de 485 nm y con diferentes concentraciones de glucosa como sustancia de referencia (Tabla 11).

Tabla 11. Concentraciones de glucosa ($\mu\text{g/ml}$).

CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/ml}$	R1 Abs	R2 Abs	R3 Abs	PROMEDIO Abs
10.0	0.587	0.578	0.584	0.583 ± 0.160
5.0	0.280	0.286	0.291	0.286 ± 0.007
2.5	0.142	0.140	0.144	0.142 ± 0.026
1.25	0.065	0.068	0.070	0.068 ± 0.037

En la curva patrón se obtuvo un coeficiente de regresión $R^2 = 0.9996$, lo cual indica que la curva realizada tiene un ajuste cuadrático bueno, y con los datos se obtuvo la ecuación $Abs_{485nm}=0.058 \cdot C$ ($\mu\text{g/ml}$), la cual fue usada para determinar la concentración de kefirán (Figura 6).

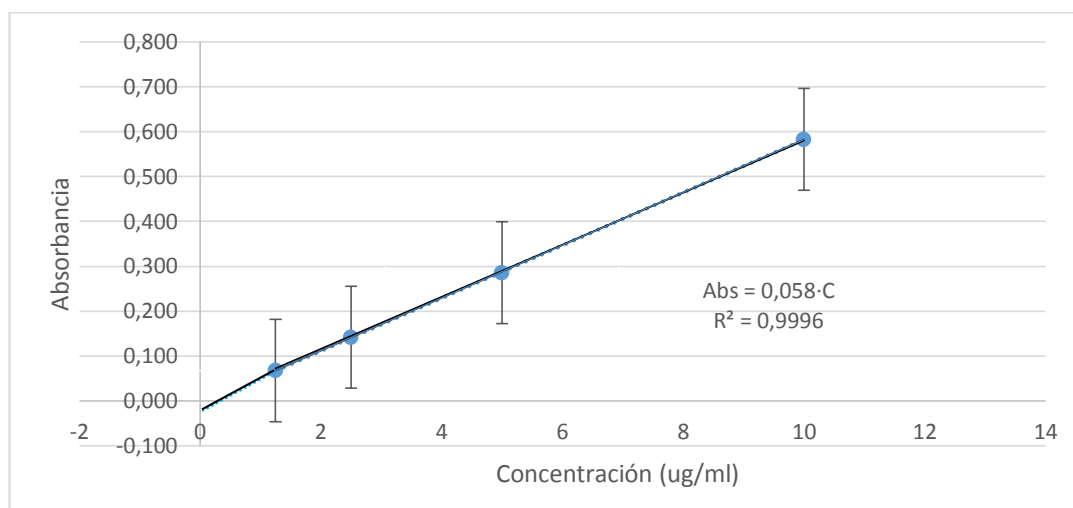


Figura 6. Curva de calibración de glucosa usada para la concentración del kefirán

La curva patrón muestra la absorbancia dentro del rango de exploración y una relación lineal hasta $10 \mu\text{g/ml}$ de la concentración de glucosa, se puede observar que tiene un comportamiento similar a la que reportan Dubois et al. (1956) en la que se aprecia una curva de absorbancia característica de azúcares.

Se puede corroborar que la curva patrón de glucosa que se realizó se puede usar para determinar la concentración de kefirán en todos los tratamientos.

4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

Al finalizar con los experimentos propuestos en el diseño, se procedió a encontrar las condiciones de fermentación óptimas que maximicen la producción de kefirán, el programa de cómputo *Design Expert 10.0*, proporcionó los datos del modelo, ANOVA y posibles combinaciones de las variables independientes que cumplan con las condiciones máximas de producción de kefirán, tal como se describe en la figura 7.

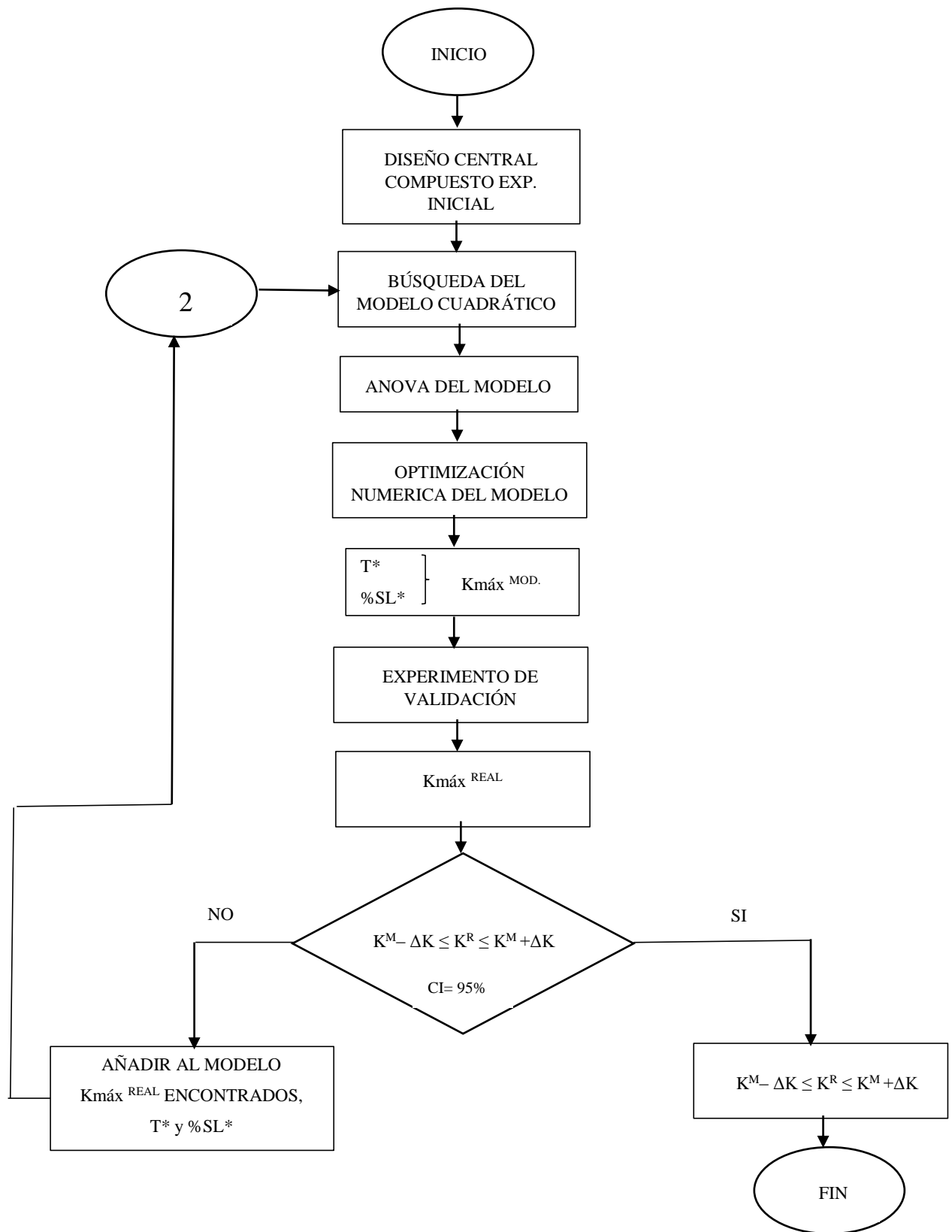


Figura 7. Diagrama de proceso para la obtención del punto óptimo de la producción de kefirán

Para la optimización de las condiciones de fermentación se realizaron los tratamientos propuestos por el diseño experimental (tabla 8), mediante los valores reales obtenidos en la experimentación de la concentración de kefirán se ajustó y se validó debidamente el modelo, y se procedió a explorar la superficie descrita por el mismo para encontrar la combinación de niveles en los factores que dan por resultado el punto óptimo (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

Los valores reales de respuesta de la variable dependiente se ajustaron a un modelo cuadrático para la concentración de kefirán.

Los modelos de segundo orden usados para estimar la concentración de kefirán, durante la fermentación fueron:

- Modelo de la variable de respuesta expresada en factores reales

$$(\text{Kefirán} + 10.00)^{0.28} = -4.42 + 0.93 T + 0.19 SL - 0.03 T * SL - 0.02 T^2 - 1.14 \times 10^{-3} SL^2 + 8.03 \times 10^{-4} T^2 * SL + 2.14 \times 10^{-4} T * SL^2 - 7.30 \times 10^{-6} T^2 * SL^2 \quad [3]$$

Donde:

(Kefirán + 10.00)^{0.28}: Concentración de kefirán (g Glu/ml)

T: Temperatura (°C)

SL: Contenido de suero de leche (%m/m)

- Modelo de la variable de respuesta expresada en factores codificados

$$(\text{Kefirán} + 10.00)^{0.28} = +4.33 + 0.22 A + 0.07 B + 0.23 AB - 0.22 A^2 - 0.21 B^2 + 0.30 A^2 B - 0.74 AB^2 - 0.28 A^2 B^2 \quad [4]$$

Donde:

(Kefirán + 10.00)^{0.28}: Concentración de kefirán (g Glu/ml)

A: Variable codificada para temperatura (°C)

B: Variable codificada para contenido de suero de leche (%m/m)

Al utilizar las ecuaciones en términos de factores codificados se facilita las interpretaciones y los cálculos, por lo que siempre que se encuentren las condiciones óptimas primero se hará en condiciones codificadas y después se traducirá a condiciones de términos reales (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

4.1.3. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

En la tabla 12, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del modelo sugerido y el análisis estadístico de la variable de respuesta que fue obtenido mediante la experimentación, el análisis de varianza de la variable de respuesta permitió conocer si el modelo estadístico sugerido es útil para determinar el punto óptimo que nos permita obtener la mayor concentración de kefirán.

El análisis de varianza para la concentración de kefirán muestra que el valor-p del modelo utilizado para la variable de respuesta es significativo debido a que muestra un valor-p < 0.05.

Tabla 12. ANOVA para el modelo de segundo orden de la concentración de kefirán (g Glu/ml) para la optimización de las condiciones de fermentación.

Kefirán (g Glu/ml)					
Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor-P Prob>F
Modelo	8	5.43	0.6786	190.66	<0.0001
A- Temp	1	0.3981	0.3981	111.86	<0.0001
B-SL	1	0.0353	0.0353	9.93	0.0092
AB	1	0.4312	0.4312	121.16	<0.0001
A ²	1	0.3990	0.3990	112.11	<0.0001
B ²	1	0.3553	0.3553	99.84	<0.0001
A ² B	1	0.3602	0.3602	101.22	<0.0001
AB ²	1	2.16	2.16	607.79	<0.0001
A ² B ²	1	0.3245	0.3245	91.19	<0.0001
Error Puro	11	0.0391	0.0036		
Correl Total	19	5.47			
R ²		0.9928			
R ² Ajustado		0.9876			
C.V. %		1.540			
Prec. Ad		45.726			

En el análisis del ANOVA del modelo de segundo orden de la concentración de kefirán muestra que, el término del efecto lineal de la temperatura (A) y el contenido de suero de leche (B), las interacciones de la temperatura con el contenido de suero de leche (AB, A²B, AB², A²B²), el término del efecto cuadrático de la temperatura (A²) y el contenido de suero de leche (B²) fueron significativos, ya que todos presentaron un valor <0.0001.

Además en el análisis de varianza muestra que, el Valor-F del Modelo de 190.66 es significativo, y el coeficiente de determinación ajustado (R²_{aj.}) de 0.9876 indica que el modelo utilizado para la búsqueda del punto óptimo es satisfactorio, ya que según Gutiérrez y de la Vara (2008) si el modelo no muestra un mínimo de 0,70 del comportamiento en la respuesta, en términos de (R²_{aj.}), no se recomienda utilizarlo para fines de optimización ya que su predicción es mala.

La figura 8 indica los valores sugeridos mediante la optimización numérica del modelo mediante el uso del paquete estadístico *Design Expert 10.0*, y para su

validación se realizaron tres experimentos con los puntos óptimos (30.5°C (T*) y 47.8% (SL*)).

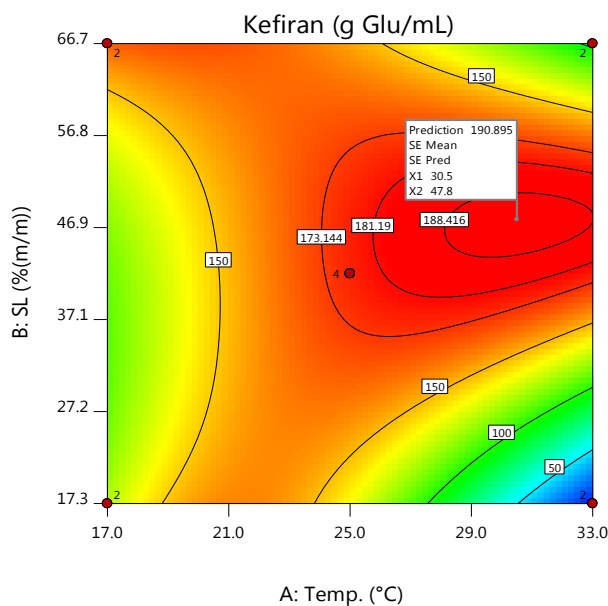


Figura 8. Plot de contorno de los valores de maximización sugeridos mediante la optimización numérica del modelo.

Los resultados obtenidos tras los experimentos de validación no cumplieron con los valores planteados en el modelo (Tabla 13).

Tabla 13. Condición óptima predicha y real para la maximización de la concentración de Kefirán

Respuesta	Media Predicha	Desv. Est.	95% IP Bajo	Media Real	95% IP Alto
Kefirán (g Glu/ml)	190.9	9.7	175.5	164.8	206.9

Se esperaba obtener valores de la concentración de kefirán (g Glu/ml) entre 175.5 a 206.9, pero tras la experimentación se obtuvieron valores promedio entre 164.8 lo cual indica que si existió diferencia significativa entre los valores predichos con los reales.

4.1.4. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL NUEVO DISEÑO EXPERIMENTAL

Ya que no se cumplió con la precisión del modelo, se procedió a añadir al diseño los nuevos valores encontrados de temperatura óptima (T^*) y contenido de suero de leche óptimo ($\%SL^*$) del modelo anterior (Figura 9).

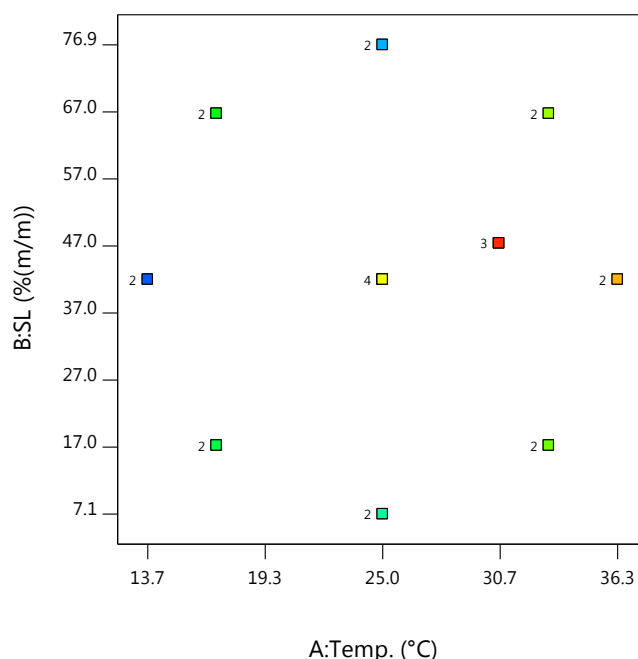


Figura 9. Plot de contorno de los valores de maximización sugeridos mediante la optimización numérica del modelo.

4.1.5. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA NUEVA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE KEFIRÁN

Mediante la nueva búsqueda del punto óptimo para la maximización de kefirán se ajustó y validó el modelo de manera correcta para encontrar la combinación de factores que den por resultado el nuevo punto óptimo explorando en la superficie de respuesta.

Se obtuvieron los valores reales de respuesta de la variable dependiente que se ajustaron a un modelo cuadrático para la concentración de kefirán.

Los modelos de segundo orden usados para estimar la concentración de kefirán fueron:

- Modelo de la variable de respuesta expresada en factores reales

$$\mathbf{Kefirán} = -1017.04 + 132.18 T + 12.38 SL - 1.64 T * SL - 4.38 T^2 - 0.06 SL^2 + 0.05 T^2 * SL + 0.01 T * SL^2 + 0.03 T^3 - 4.67 \times 10^{-4} T^2 * SL^2 \quad [5]$$

Donde:

Kefirán: Concentración de kefirán (g Glu/ml)

T: Temperatura (°C)

SL: Contenido de suero de leche (%m/m)

- Modelo de la variable de respuesta expresada en factores codificados

$$\mathbf{Kefirán} = +176.75 - 8.56 A + 7.88 B + 10.91 AB - 28.15 A^2 - 28.50 B^2 + 21.35 A^2B - 54.50 AB^2 + 17.40A^3 - 18.24 A^2B^2 \quad [6]$$

Donde:

Kefirán: Concentración de kefirán (g Glu/ml)

A: Variable codificada para temperatura (°C)

B: Variable codificada para contenido de suero de leche (%m/m)

La ecuación en términos de factores codificados es útil para identificar el impacto relativo de los factores al comparar los coeficientes del factor y tanto la ecuación en

términos de factores reales como codificados pueden usarse para hacer predicciones sobre la respuesta para niveles de cada factor.

4.1.6. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN

En la Tabla 15 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del modelo sugerido, este análisis de varianza de la variable de respuesta permitió conocer si el nuevo modelo estadístico sugerido es útil para determinar el punto óptimo que nos permita obtener la mayor concentración de kefirán.

Tabla 14. ANOVA para el modelo cuadrático sugerido para la concentración de kefirán (g Glu/ml) en la optimización de las condiciones de fermentación.

Fuente	GL	Kefirán (g Glu/ml)			
		Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor-P Prob>F
Modelo	9	50004.24	5556.03	60.14	<0.0001
A- Temp	1	39.19	39.19	0.4242	0.5262
B-SL	1	497.29	497.29	5.38	0.0372
AB	1	952.66	952.66	10.31	0.0068
A ²	1	6339.38	6339.38	68.62	<0.0001
B ²	1	6498.00	6498.00	70.34	<0.0001
A ² B	1	1823.85	1823.85	19.74	0.0007
AB ²	1	4845.51	4845.51	52.45	<0.0001
A ³	1	584.72	584.72	6.33	0.0258
A ² B ²	1	1330.43	1330.43	14.40	0.0022
Error Puro	13	1200.93	92.38		
Correl Total	22	51205.17			
R ²		0.9765			
R ² Predicho		0.9307			
R ² Ajustado		0.9603			
C.V. %		7.41			
Prec.		25.3566			
Adec					

El análisis de varianza para la concentración de kefirán muestra que el valor-p del modelo utilizado para la variable de respuesta es significativo debido a que muestra un valor-p < 0.05.

En el análisis del ANOVA del modelo de segundo orden de la concentración de kefirán muestra que, el término del efecto lineal del contenido de suero de leche (B), las interacciones de la temperatura de incubación con el contenido de suero de leche (AB, A²B, AB², A²B²), el término del efecto cuadrático de la temperatura (A²), el efecto cuadrático del contenido de suero de leche (B²) y el efecto cúbico de la temperatura (A³) fueron significativos. Mientras que el término del efecto lineal de la temperatura (A) no es significativo ya que indica un valor-p por encima del intervalo de confianza.

Además, en el análisis de varianza muestra que, el coeficiente de determinación predicho (R²_{pred.}) de 0.9307 está en acuerdo razonable con el coeficiente de determinación ajustado (R²_{aj.}) de 0.9603 ya que presenta una diferencia de tan solo 0.02, la Precisión Adec. muestra una proporción de 25.357 lo cual indica una señal adecuada, estos valores obtenidos del análisis de varianza son satisfactorios lo cual indica que el modelo utilizado para la búsqueda por el espacio del diseño para encontrar el punto óptimo son los adecuados.

4.1.7. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO SUGERIDO PARA LA MAXIMIZACIÓN DE KEFIRÁN

Una vez analizado el ANOVA del modelo sugerido se procedió a encontrar el punto óptimo para lo cual el paquete estadístico nos sugirió dos combinaciones de los niveles de los factores que cumplen con las condiciones óptimas, se escogió uno de ellos para realizar la validación del modelo, tal como se describe en la tabla 15.

Tabla 15. Condiciones óptimas para la maximización de kefirán según el modelo sugerido

Número	Temp. Ópt. (T*) (°C)	Cont. Suero de leche Ópt. (%SL*) (%m/m)	Concentración Máx. Kefirán (g Glu/ml)
1	23.90	46.00	178.09
2	19.97	66.70	174.90

Para validar el modelo sugerido, se realizaron tres experimentos similares, en el punto óptimo seleccionado de (23.90 \cong 24°C y 46% (%m/m) SL).

Además, otros autores reportaron una temperatura óptima de incubación de 20°C (Rimada y Abraham, 2001; Londero, Hamet, De Antoni, Garrote y Abraham, 2012), y de 24.3°C (Sabokbar et al., 2015). Mientras que otros autores reportan temperaturas de 25°C (Mazaheri et al., 2008) y hasta de 30°C (Athanasiadis, Boskou, Kanellaki, Kiosseoglou y Koutinas, 2002; Dailin et al., 2016).

Los resultados obtenidos tras la experimentación confirmaron la precisión del modelo cuadrático para la maximización de la concentración de kefirán, ya que la media no presentó diferencia significativa entre los valores predichos y los valores reales, tal como se describe en la tabla 16.

Tabla 16. Condición óptima predicha y real para la maximización de kefirán

Respuesta	Media Predicha	Desv. Est.	95% IP Bajo	Media Real	95% IP Alto
Kefirán (g Glu/ml)	178.1	9.6	161.7	177.5	194.5

4.1.8. REPRESENTACIONES GRÁFICAS DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE KEFIRÁN

En la figura 10, se muestra el valor óptimo escogido para la maximización de kefirán que fue obtenido de las variables independientes sugeridas por el programa de cómputo. Para la exploración de la concentración máxima de kefirán se estima valores próximos a 177.5 g Glu/ml la cual es superior al comparar con los resultados de otra investigación realizada por Sabokbar et al. (2015) que obtuvieron una concentración de 61.72 g Glu/ml.

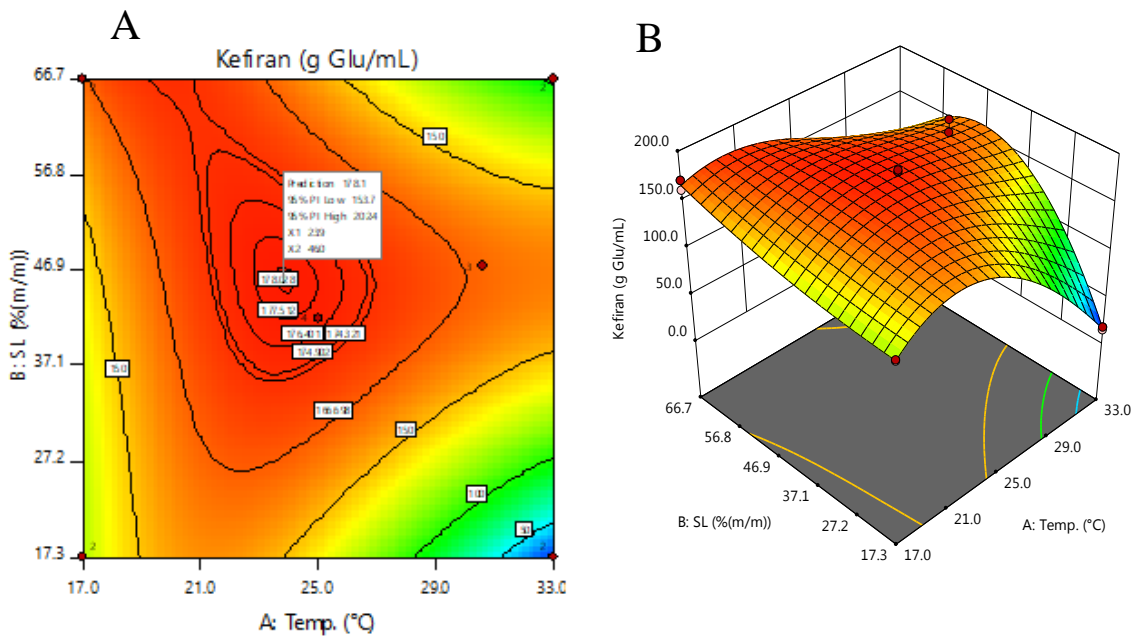


Figura 10. A) Plot de Contorno del punto óptimo de la maximización de kefirán; B) Representación gráfica 3D del punto óptimo para la maximización de kefirán

4.2. ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE KEFIRÁN A ESCALA DE LABORATORIO

Uno de los propósitos de esta investigación fue establecer un proceso adecuado para la obtención de kefirán. Después de los experimentos de verificación ($T^* = 24^{\circ}\text{C}$; $SL^* = 46\%$) para corroborar la precisión del modelo sugerido se procedió a realizar algunos experimentos más antes de establecer el proceso definitivo, tal como se describe a continuación.

4.2.1. EXPERIMENTO DE FERMENTACIÓN A 48 Y 72 h; A 24°C Y 46%SL.

Para este experimento se realizaron 6 repeticiones, 3 para la fermentación a 48 h y 3 para la fermentación a 72 h (tabla 17).

Tabla 17. Experimento de fermentación a 48 y 72 h.

Simb.	Fermt. (h)	CONCENTRACIÓN DE KEFIRÁN (g Glu/ml) A 48 Y 72 h			Simb.	Fermt. (h)	CONCENTRACIÓN DE KEFIRÁN (g Glu/ml) A 48 Y 72 h		
		Abs 1	Abs 2	Promedio			Abs 1	Abs 2	Promedio
S1	48	177.0	166.0	171.5±7.8	S4	72	136.6	96.6	116.6±28.3
S2	48	182.0	159.0	170.5±16.3	S5	72	123.6	110.6	117.1±9.2
S3	48	163.2	166.1	164.6±2.0	S6	72	121.5	123.5	122.5±1.4
			PROM.	168.9±3.70				PROM.	118.7±3.30

La tabla 18 muestra los resultados tras 48 y 72 h de fermentación del experimento, en el que se puede apreciar un valor promedio de la concentración de kefirán en las 48 h de fermentación de 168.9 ± 3.70 g Glu/ml que se encuentran dentro del rango de las condiciones óptimas de maximización de kefirán presentadas por el modelo las cuales están entre 161.7 y 194.5 g Glu/ml, mientras que los valores en las 72 h de fermentación no se encuentran dentro del rango del punto óptimo ya que presentó un valor promedio de 118.7 ± 3.30 g Glu/ml.

Al analizar los resultados de la tabla 17, podemos concluir que el tiempo óptimo de fermentación que maximiza la concentración de kefirán es a las 48 h, lo cual coincide con el tiempo óptimo que reportan los autores Rimada y Abraham (2001).

4.2.2. EXPERIMENTO CON MUESTRA HOMOGENIZADA Y MUESTRA CON SOBRENADANTE PARA OBTENCIÓN DE KEFIRÁN, BAJO LAS CONDICIONES DE 24°C Y 46%SL.

Se realizaron 3 experimentos de 2 repeticiones cada uno, en los cuales 1 correspondió a la muestra homogenizada y 1 a la muestra de sobrenadante, cada unidad experimental fue de 200 ml.

Llamamos experimento con muestra homogenizada a aquellos que, al terminar el tiempo de fermentación se realizó una inactivación térmica a 65°C por 15 min de las muestras y luego se las homogenizó por un tiempo de 10 min con la ayuda de una licuadora lo cual permitió obtener una mezcla con partículas mucho más pequeñas; y llamamos experimento con muestra con sobrenadante a aquellos que al finalizar el tiempo de fermentación se procedió a retirar el inóculo (gránulo de kéfir) de las mezclas y posteriormente se realizó la inactivación térmica bajo las mismas condiciones que la muestra homogenizada.

Tanto la muestra homogenizada como la muestra con sobrenadante fueron llevadas a precipitación con solvente orgánico con una relación 50:50 de muestra con alcohol absoluto, es decir que se utilizó 200 ml de muestra y 200 ml de alcohol absoluto para

la precipitación; y con una relación 40:60 de muestra con el alcohol técnico, es decir que se utilizó 200 ml de muestra y 300 ml de alcohol técnico. Cada uno de los experimentos fue llevado hasta la etapa final del proceso, es decir hasta el secado y obtención de kefirán, expresado en g/l.

En la tabla 18, se muestran los datos obtenidos de kefirán al finalizar cada uno de los experimentos con precipitación con alcohol absoluto y con alcohol técnico, mediante el uso del programa de cómputo *StatGraph* se hizo un análisis estadístico el cual muestra que entre los valores obtenidos de las medias de muestra homogenizada y con sobrenadante de los dos solventes orgánicos no existe diferencia significativa, con un nivel de confianza del 95%, pese a que en los dos casos en los experimentos con muestra homogenizada se observa que obtiene mayor cantidad de kefirán.

Tabla 18. Pesos obtenidos de cada experimento al final del proceso de muestra homogenizada y muestra con sobrenadante

EXP.	ALCOHOL ABSOLUTO		ALCOHOL TÉCNICO	
	Sobrenadante (g/l)	Homogenizado (g/l)	Sobrenadante (g/l)	Homogenizado (g/l)
1	5.50	5.50	5.28	4.10
2	4.00	5.75	5.20	5.45
3	4.40	5.35	5.05	5.45
Prom.	4.63	5.53	5.18	5.00
Des. Est.	0.78	0.20	0.12	0.78
Mín.	4.00	5.35	5.05	4.10
Máx.	5.50	5.75	5.28	5.45
IC 95%	4.63±1.92	5.53±0.50	5.18±0.40	5.00±0.60

La figura 11 muestra la representación gráfica del rendimiento de los pesos obtenidos de los experimentos de muestra homogenizada y con sobrenadante, la letra “a” indica que estadísticamente no existe diferencia significativa con un intervalo de confianza del 95% entre muestra homogenizada y con sobrenadante tanto para el caso del alcohol absoluto como del alcohol técnico, además se realizó un control negativo el cual se lo realizó con la ausencia del inóculo (gránulos de kefir) a las mismas condiciones y presumiblemente el resultado que presenta en la gráfica es la fermentación de la lactosa y la sacarosa.

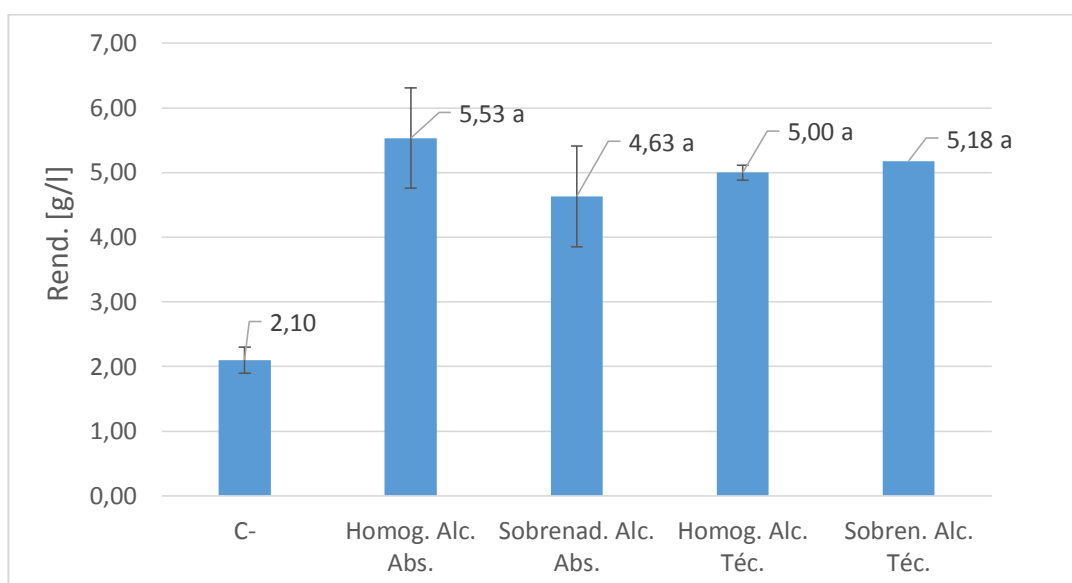


Figura 11. Representación gráfica de los rendimientos de muestras homogenizadas y con sobrenadante de alcohol técnico y alcohol absoluto.

En otras investigaciones otros autores reportan valores máximos de kefirán de 1.91 g/l (Dailin et al., 2016), 1.17 g/l como obtuvo Cheirsilp y Radchabut (2011) y valores hasta de 3.1 g/l (Alvarado, 2018).

4.2.2.1. Espectro-barridos de los lavados de muestras homogenizadas y muestras con sobrenadante.

En el proceso de obtención de kefirán se realizan centrifugaciones (I, II, III, IV) con el fin de que en la última realizada en cada experimento se obtengan precipitados blancos (*pellets*) limpios, es así que, al resultante de la centrifugación se le retiró el sobrenadante y al residual sólido (*pellet*) se le añadió 10 ml de agua esterilizada a 70°C, se le re-suspendió en un *vortex* y se lo llevó nuevamente a centrifugación, este procedimiento aplica en todas las centrifugaciones, y se le añade agua destilada caliente con el fin de remover todos los compuestos orgánicos que pueden ser solubles en el agua.

Para el espectro-barrido de todas las centrifugaciones (I, II, III, IV) de las muestras homogenizadas y con sobrenadante se utilizó el espectrofotómetro Jenway UV/Vis (modelo 6705 UV/Vis) a una longitud de onda desde 190 – 1100 nm, el blanco en este caso fue el agua esterilizada (figura 12).

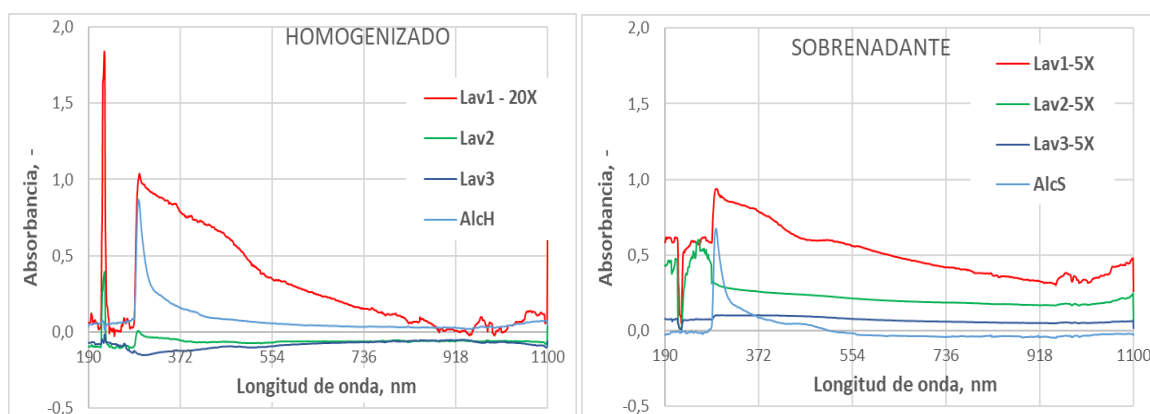


Figura 12. Espectro-barridos de muestra homogenizada y sobrenadante

La figura 12 muestra las gráficas tanto de los espectro-barridos de las muestras homogenizadas y con sobrenadante e indican que los procesos de centrifugación están cumpliendo con el propósito, ya que se aprecia que tras el lavado 1 (líneas rojas) sale la mayor cantidad de compuestos orgánicos que tiene el kefirán, en los lavados posteriores 2 y 3 (líneas verdes y azul oscuro) se puede observar que cada vez se acercan más a la línea basal lo cual indica que la presencia de compuestos orgánicos es baja y lo que se está obteniendo es un mayor proporción de agua que de impurezas.

Además, en la figura 12 los distintos picos que presenta la gráfica indican que, en la longitud de onda entre los 190 nm existe la presencia de los restos de los residuales alcohólicos que quedaron tras la precipitación con el solvente orgánico, y presumiblemente, los picos formados entre la longitud de onda de 210 a 300 nm exista una mezcla de proteínas, y alrededor de los 510 nm se puede encontrar azúcares tanto monosacáridos como disacáridos como por ejemplo glucosa, galactosa, entre otros.

Además la figura 13 indica como la cantidad de compuestos orgánicos van disminuyendo tras cada una de las centrifugaciones acercándose cada vez más a la línea basal (agua esterilizada).



Figura 13. Resultantes de los experimentos de cada una de las centrifugaciones

4.3. DETERMINACIÓN DE LA CARGA CONTAMINANTE (DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO Y DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO) DE LOS EFLUENTES DEL PROCESO VERSUS EL VALOR DEL MATERIAL DE PARTIDA EN EL ESTUDIO.

Para la determinación de la carga contaminante de los efluentes del proceso versus el valor del material de partida en el estudio, se realizó análisis de DQO al pool de los efluentes, es decir a los volúmenes de los sobrenadantes resultantes de cada una de las centrifugaciones del proceso (Centrifugación I, II, III, IV) y al material de partida (suero de leche) (figura 14).

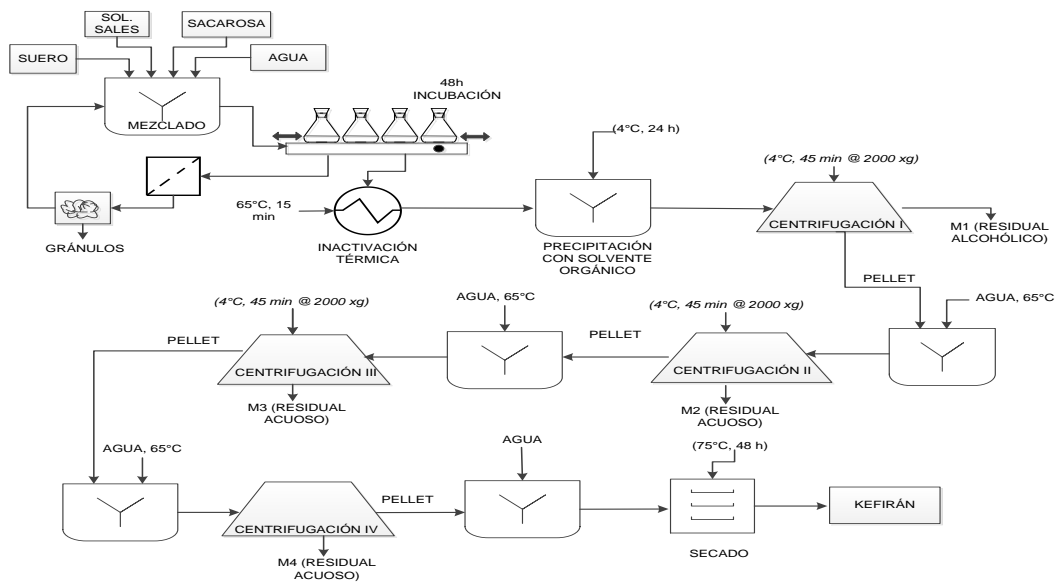


Figura 14. Diagrama de proceso de los efluentes del proceso de obtención de kefirán

La figura 15, representa como sería el proceso de los efluentes que son evacuados hacia la planta de tratamiento, en la figura se indican los volúmenes de los sobrenadantes resultantes de los lavados de cada una de las centrifugaciones, con los cuales se realiza una mezcla de residuales para obtener un volumen total el cual tiene como destino final la planta de tratamiento.

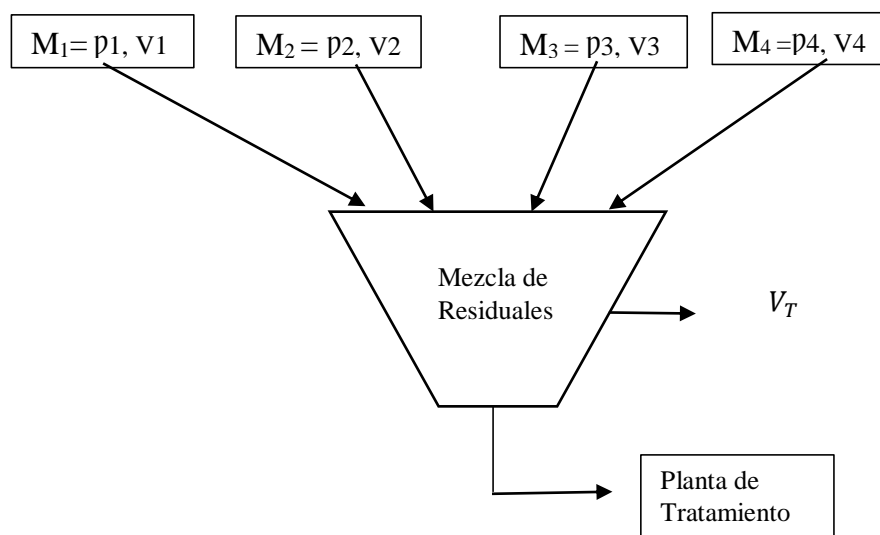


Figura 15. Diagrama de proceso de los efluentes que son evacuados hacia la planta de tratamiento

Además, para los análisis de DBO y DQO de los efluentes del proceso, se realizó un pool representativo de los diferentes efluentes (M_1 , M_2 , M_3 , M_4) de la siguiente manera:

$$MT = M_1 + M_2 + M_3 + M_4 \quad [7]$$

Donde:

MT = Masa total de los efluentes

M_1 = Masa de sobrenadante de la extracción alcohólica de la primera centrifugación

M_2 = Masa de sobrenadante del lavado de la segunda centrifugación

M_3 = Masa de sobrenadante del lavado de la tercera centrifugación

M_4 = Masa de sobrenadante del lavado de la cuarta centrifugación

La ecuación 7 indica que la sumatoria de las masas de los volúmenes (M_1 , M_2 , M_3 , M_4) es igual a la masa total (MT), y además con los lavados se obtiene los valores de la densidad y el volumen de cada centrifugación, lo que también permite calcular la masa (M) multiplicando la densidad (ρ) por el volumen (v), como se indica en la siguiente ecuación.

$$MT = \rho_1 V_1 + \rho_2 V_2 + \rho_3 V_3 + \rho_4 V_4 \quad [8]$$

Una vez calculada la masa total (MT) con las densidades y volúmenes, se procedió a calcular la fracción másica en la cual la sumatoria de sus componentes debe ser igual a 1, éste cálculo se lo realizó dividiendo la masa de la centrifugación (M_*) entre la masa total (MT), como se observa en las siguientes ecuaciones.

$$1 = \frac{M_1}{MT} + \frac{M_2}{MT} + \frac{M_3}{MT} + \frac{M_4}{MT} \quad [9]$$

$$1 = fm_1 + fm_2 + fm_3 + fm_4 \quad [10]$$

Y para obtener el pool representativo de cada uno de los efluentes de las centrifugaciones, se multiplicó la fracción másica (fm) con la masa de la muestra que se desea obtener (M_m) dividido para la densidad (ρ), tal como se indica en la siguiente ecuación.

$$V_{1Repre.} = \frac{fm_1 M_m}{\rho_1} \quad [11] \quad V_{2Repre.} = \frac{fm_2 M_m}{\rho_2} \quad [12]$$

$$V_{3Repre.} = \frac{fm_3 M_m}{\rho_3} \quad [13] \quad V_{4Repre.} = \frac{fm_4 M_m}{\rho_4} \quad [14]$$

Una vez obtenido los pool representativos de los experimentos con muestras homogenizadas y con sobrenadante, y la muestra del material de partida (suero de leche), se procedió a realizar el análisis de DQO de cada uno de ellos (Tabla 19).

Tabla 19 . DQO [kg/m³] de los pool representativos de los experimentos y del material de partida.

DQO [kg/m ³]				
Suero	Homog. Alc. Abs.	Sobrenad. Alc. Abs.	Homog. Alc. Téc.	Sobren. Alc. Téc.
100.9	344.0	283.0	445.0	321.0
85.7	335.0	358.0	400.0	409.0
85.6	352.0	346.0	376.0	437.0
84.2	-	-	-	-

En la figura 16 la representación gráfica de los valores promedio de DQO de los experimentos, se realizó un análisis estadístico múltiple mediante el uso del programa *StatGraph*, el cual demostró que tanto para los experimentos con alcohol absoluto como para los de alcohol técnico no hay diferencia significativa entre las muestras homogenizadas y con sobrenadante, pero si existe diferencia significativa con un intervalo de confianza del 95% entre la muestra homogenizada del alcohol técnico

con el resto de muestras lo que indica que es el experimento que tiene la mayor carga contaminante.

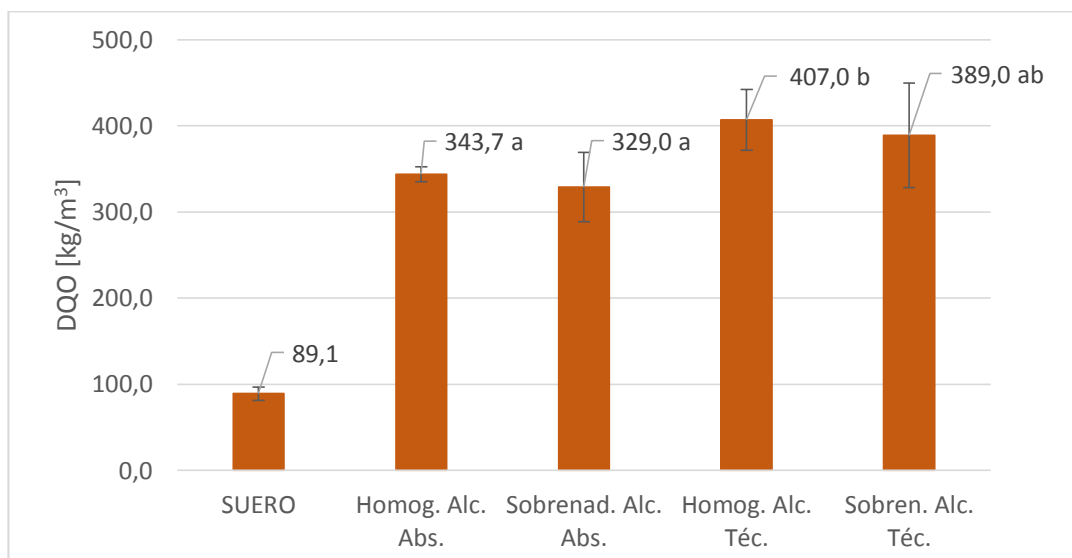


Figura 16. Representación gráfica de los valores de DQO obtenidos de los elfuentes y el material de partida del experimento

4.3.1. ANÁLISIS DE LOS COSTOS DEL PROCESO DE OBTENCION DE KEFIRÁN A ESCALA DE LABORATORIO

Se realizó un análisis de los costos con el objetivo de identificar los recursos que se debe tomar en cuenta para la producción de kefirán en un lote de 200ml de caldo de cultivo; los costos del proceso utilizando alcohol absoluto como solvente se muestran en la tabla 20, mientras que en la tabla 21 se muestran los costos del proceso utilizando alcohol técnico como solvente.

Tabla 20. Costos del proceso de obtención de kefirán por lote utilizando alcohol absoluto como solvente

COSTOS DE REACTIVOS POR LOTE (200ml DE CALDO DE CULTIVO)				
Reactivo	Unidad	Cantidad	Precio unit.	Precio total
Suero	l	0.092	0.50	0.05
Gránulo kéfir	g	7.40	0.14	1.04
Sacarosa	g	28.60	0.02	0.57
KH ₂ PO ₄	g	1.00	0.03	0.03
MgSO ₄	g	5.00	0.03	0.15
(NH ₄) ₂ SO ₄	g	1.00	0.06	0.06
Agua destilada	l	0.058	1.90	0.11
Alcohol Absoluto	l	0.20	105.47	21.09
			Total	23.10
COSTOS DE ELECTRICIDAD POR LOTE				
Equipo	Kw	Horas de uso (h)	Costo tarifa eléctrica (Kw/h)	Costo (USD)
Autoclave	3.2	1	0.09	0.29
Agitador Reciprocante termostatado	1.0	48	0.09	4.32
Centrífuga refrigerada	1.2	3	0.09	0.32
Estufa	2.5	48	0.09	10.80
			Total	15.73
COSTOS DEPRECIACIÓN EQUIPOS POR LOTE				
Equipo	Costo	Vida útil	Deprec. por año (\$)	Deprec. semanal(\$)
Autoclave	8500	10 años	856.35	21.04
Baño Maria con Agitación	11500	10 años	1145.66	28.64
Centrífuga refrigerada	13000	10 años	1314.76	32.86
Estufa	14000	8 años	181.66	4.54
		Total	3498.43	87.08
COSTOS SALARIOS POR LOTE				
Horas trabajadas	Días	Total (h)	Costo hora (\$)	Costo total (\$)
6	5	30	2.28	68.40
			COSTO TOTAL LOTE	194.31
			Rendimiento produc. Kefirán (g/l)	4.63±1.92

Tabla 21. Costos del proceso de obtención de kefirán por lote utilizando alcohol técnico como solvente

COSTOS DE REACTIVOS POR LOTE (200ml DE CALDO DE CULTIVO)				
Reactivo	Unidad	Cantidad	Precio unit.	Precio total
Suero	l	0.092	0.50	0.05
Gránulo kéfir	g	7.40	0.14	1.04
Sacarosa	g	28.60	0.02	0.57
KH ₂ PO ₄	g	1.00	0.03	0.03
MgSO ₄	g	5.00	0.03	0.15
(NH ₄) ₂ SO ₄	g	1.00	0.06	0.06
Agua destilada	l	0.058	1.90	0.11
Alcohol Técnico	l	0.30	10.00	3.00
			Total	5.01
COSTOS DE ELECTRICIDAD POR LOTE				
Equipo	Kw	Horas de uso (h)	Costo tarifa eléctrica (Kw/h)	Costo (USD)
Autoclave	3.2	1	0.09	0.29
Agitador Reciprocante termostatado	1.0	48	0.09	4.32
Centrífuga refrigerada	1.2	3	0.09	0.32
Estufa	2.5	48	0.09	10.80
			Total	15.73
COSTOS DEPRECIACIÓN EQUIPOS POR LOTE				
Equipo	Costo	Vida útil	Deprec. por año (\$)	Deprec. semanal(\$)
Autoclave	8500	10 años	856.35	21.04
Baño Maria con Agitación	11500	10 años	1145.66	28.64
Centrífuga refrigerada	13000	10 años	1314.76	32.86
Estufa	14000	8 años	181.66	4.54
		Total	3498.43	87.08
COSTOS SALARIOS POR LOTE				
Horas trabajadas	Días	Total (h)	Costo hora (\$)	Costo total (\$)
6	5	30	2.28	68.40
			COSTO TOTAL LOTE	176.22
			Rendimiento produc. Kefirán (g/l)	5.18±0.40

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El valor promedio de 177.5 g Glu/ml se encontró dentro del rango de valores predichos, por lo que se estableció que la maximización de la producción de kefirán se logrará con una temperatura de 24°C y 46% de contenido de suero de leche.
- Las mejores condiciones que se obtuvieron para la producción de kefirán fueron a las 48h de fermentación, realizando los experimentos de muestra con sobrenadante y uso del alcohol técnico como solvente orgánico, además, realizando espectro-barridos a una longitud de onda entre 190-1100 nm ya que mostró que cuando se lava el *pellet* de las muestras tras cada centrifugación van disminuyendo los compuestos orgánicos.
- En los análisis de DQO se demostró que si existe diferencia significativa entre la muestra homogenizada del alcohol técnico con el resto de muestras lo que indica que es el experimento que tiene la mayor carga contaminante de todos, pero tanto para los experimentos con alcohol absoluto como para los de alcohol técnico no existe diferencia significativa entre las muestras homogenizadas y con sobrenadante.

5.2. RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar experimentos reutilizando el gránulo de kéfir que es retirado al finalizar el proceso de fermentación para corroborar si se logra obtener el mismo rendimiento al final del proceso, y además conocer cuantas veces se lo puede volver a utilizar.
- Se sugiere medir la conductividad de la concentración de las sales, para comprobar que con cada uno de los lavados de las centrifugaciones se acerca cada vez mas a la conductividad del agua.
- En la muestra del proceso final de la obtención de kefirán es viable realizar una cromatografía de capa delgada en donde se puedan visualizar los diferentes azucres que se encuentren en la muestra tales como disacaridos , monosacaridos y polisacáridos.
- Se sugiere realizar el proceso piloto en una escala semi industrial y comprobar si se reproducen los rendimientos obtenidos pero en una mayor escala.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, P. (2018). *Desarrollo de un bioproceso para la obtención de una bebida funcional a partir de lactosuero en polvo y gránulos de kéfir*. Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte, Ecuador.
- Athanasiadis, I., Boskou, D., Kanellaki, M., Kiosseoglou, V., y Koutinas, A. A. (2002). Whey liquid waste of the dairy industry as raw material for potable alcohol production by kefir granules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7231-7234.
- Badel, S., Bernardi, T., y Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1), 54-66.
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., y Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of The Total Environment*, 2 (445-446), 385-396.
- Cerning, J. (1999). Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. *Developments in Microbiology*, 75(4), 195-209.
- Cheirsilp, B., y Radchabut, S. (2011). Use of whey lactose from dairy industry for economical kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts. *New Biotechnology*, 28(6), 574-580.
- Contexto Ganadero. (17 de 07 de 2015). *Contexto Ganadero*. Obtenido de <http://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/conozca-como-hacer-kefir-de-leche-y-los-beneficios-de-consumirlo>

- Dailin, D. J., Elsayed, E. A., Othman, N. Z., Malek, R., Phin, H. S., Aziz, R., ... El Enshasy, H. A. (2016). Bioprocess development for kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in semi industrial scale bioreactor. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(4), 495-502.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., y Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *First International Symposium on Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: from Fundamentals to Applications*, 11(9), 687-707.
- Degeest, B., Vaningelgem, F., y De Vuyst, L. (2001). Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *First International Symposium on Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: from Fundamentals to Applications*, 11(9), 747-757.
- Dubois, M., Gilles, H. J., Rebers, A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Farnworth, E. R. (2005). Kefir a complex probiotic. *Food Science Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1), 1-17.
- Folkenberg, D. M., Dejmeek, P., Skriver, A., Skov Guldager, H. e Ipsen, R. (2006). Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. *International Dairy Journal*, 16(2), 111-118.

- Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M., y Simov, Z. I. (2002).
Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains.
Zeitschrift Für Naturforschung C, 57(9-10), 805-810.
- Gutiérrez, H., y De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. Mexico
D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Hernández-Rojas, M, y Vélez-Ruiz, J. (2014). Suero de leche y su aplicación en la
elaboración de alimentos funcionales, *Temas selectos de ingeniería en
Alimentos*, 8(2), 13-22.
- Huertas, R. A. P. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos, *Red
de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*,
16(62), 20-29.
- INAMHI. (Marzo de 2017). *INAMHI*. Obtenido de INAMHI:
http://www.serviciometeorologico.gob.ec/meteorologia/bolhist/cli/2017/MENSUAL/bol_men_03.pdf
- INEC. (2017). *Instituto Nacional de Estadística y Censos*. Obtenido de
http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2017/Informe_Ejecutivo_ESPAC_2017.pdf
- INEN. (08 de 2011). *Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización*. Recuperado
el 18 de 05 de 2016, de
<https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2594.2011.pdf>

- Jelen, P. (2003). Whey processing. Utilization and Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 79 (1), 2739 - 2745.
- Kilic, D., Demirhan, E., Ozel, B., y Ozbek, B. (2015). Kefir grains biomass productions: Influence of different culturing conditions and examination of growth kinetic models. *Journal of Food Process Engineering*, 20(8), 1-9.
- Kök-Taş, T., Seydim, A. C., Özer, B., y Guzel-Seydim, Z. B. (2013). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 780-789.
- Koutinas, M., Menelaou, M., y Nicolaou, E. N. (2014). Development of a hybrid fermentation–enzymatic bioprocess for the production of ethyl lactate from dairy waste. *Special Issue: CESE 2013 & Special Issue: ICABB 2013*, 165, 343-349.
- Londero, A., Hamet, M. F., De Antoni, G. L., Garrote, G. L., y Abraham, A. G. (2012). Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. *Journal of Dairy Research*, 79(03), 262-271.
- Londoño, M. (2006). Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. *Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética*, 24(16), 11-20.
- Magalhães, K. T., Dias, D. R., de Melo Pereira, G. V., Oliveira, J. M., Domingues, L., Teixeira, J. A., ... Schwan, R. F. (2011). Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as

- starter culture: Chemical and sensory analysis of CW-based kefir beverages. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(4), 871-878.
- Mazaheri Assadi, M., Abdolmaleki, F., y Mokarrame, R. R. (2008). Application of whey in fermented beverage production using kefir starter culture. *Nutrition & Food Science*, 38(2), 121-127.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., y Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), 1-14.
- Parra, R. (16 de 06 de 2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Revista Bio-Agro*, 8(1), 94-102.
- Patel, A., y Prajapati, J. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *Advances in dairy research*, 1(2),2-7.
- Pescuma, M., de Valdez, G. F., y Mozzi, F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), 6183-6196.
- Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M. A. y Abraham, A. G. (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 Hydrocolloids*, 25(5), 1261-1269.
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., y Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: composition,

- microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-7.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., y Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.
- Reis, J. S., y Teixeira, J. A. (2011). Potential applications of whey proteins in the medical field. En *Engineering Aspects of Milk and Dairy Products* (págs. 221-252). New York: CRC Press.
- Rimada, P. S., y Abraham, A. G. (2001). Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 68(04), 653-661.
- Sabokbar, N., Moosavi-Nasab, M., y Khodaiyan, F. (2015). Preparation and characterization of an apple juice and whey based novel beverage fermented using kefir grains. *Food Science and Biotechnology*, 24(6), 2095-2104.
- Shah, N. (2013). Effect of carbon dioxide on sensory attributes, physico-chemical parameters and viability of probiotic *L. helveticus* MTCC 5463 in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 3886-3893.
- Silva, M. F., Fornari, R. C. G., Mazutti, M. A., de Oliveira, D., Padilha, F. F., Cichoski, A. J., ... Treichel, H. (2009). Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 119-123.
- Valencia, E., y Ramirez, M. (2009). La industria láctea y la contaminación del agua. *Elementos* 73, 27-31.

- Viljoen, B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *Yeast in Dairy Products*, 69(1), 37-44.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., y Song, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(3), 283-288.
- Welman, A. D., y Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269-274.
- Zajšek, K., Goršek, A., y Kolar, M. (2013). Cultivating conditions effects on kefiran production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chemistry*, 139(1-4), 970-977.
- Zajšek, K., Kolar, M., y Goršek, A. (2011). Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 64(4), 544-548.

