

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**“DISEÑO DEL BIORREACTOR A NIVEL BANCO PARA  
LA PRODUCCIÓN DE KÉFIR DE LECHE”**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO QUÍMICO

**EVELYN COLETTE HUILLCA AVILA**

Callao, 2021

**PERÚ**

Two handwritten signatures in black ink are located to the right of the text "Callao, 2021". The first signature is more legible and appears to be "E. Huillca", while the second is a stylized signature.



## PRÓLOGO DEL JURADO

La presente Tesis fue Sustentada por la señorita Bachiller HUILLCA AVILA EVELYN COLETTE ante el JURADO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS conformado por los siguientes Profesores Ordinarios:

ING° DR. CARLOS ALEJANDRO ANCIETA DEXTRE      PRESIDENTE

LIC DR. SALVADOR APOLINAR TRUJILLO PEREZ      SECRETARIO

ING° MG GLADIS ENITH REYNA MENDOZA      VOCAL

ING° MG FABIO MANUEL RANGEL MORALES      ASESOR

Tal como está asentado en el Acta N° 004-2021-JS-FIQ de fecha **DIEZ DE JULIO DE 2021**, para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico en la Modalidad de Titulación de Tesis con Ciclo de Tesis, de conformidad establecido por el Reglamento de Grados y Títulos aprobado con Resolución N°245-2018-CU de fecha 30 de octubre de 2018.

## DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la vida y darme permanentemente salud.

A mis padres Wilber y Nancy, por haberme forjado como persona que soy; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este.

A mi madrina Delia Chaparro Tacuri por su apoyo, consejo, que me inspira a ser mejor persona y gran profesional.

A la memoria de mi querida mamita Juliana Tacuri Ramos

Además, a mis hermanos Anais y Adriano más que hermanos son mis verdaderos amigos.

## **AGRADECIMIENTO:**

A la Universidad Nacional del Callao y en especial a la Facultad de Ingeniería Química y a la Unidad de Investigación, a todo su cuerpo directivo y personal administrativo por haber contribuido a la consolidación de la presente Investigación.

Agradecer de forma especial a Ing. Fabio Rangel Morales, quien oriento en el tratamiento de la presente investigación con gran rigor científico y apoyo constante hasta la culminación de la presente investigación.

## ÍNDICE

TABLAS DE CONTENIDO.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	11
1.1. Descripción de la realidad problemática.....	11
1.2 Formulación del problema. ....	13
1.2.1. Problema general.....	13
1.2.2. Problemas específicos.....	13
1.3. Objetivos.....	14
1.3.1. Objetivo general .....	14
1.3.2. Objetivos específicos.....	14
1.4. Límites de investigación (teórica, temporal, espacial).....	14
II. MARCO TEÓRICO.....	15
2.1. Antecedentes.....	15
2.1.1. Antecedentes Internacionales.....	15
2.1.2. Antecedentes Nacionales .....	18
2.2. Bases teóricas.....	21

2.2.1. Proceso de fermentación.....	21
2.2.2. Kéfir.....	22
2.2.3. Proceso de fermentación del kéfir.....	27
2.2.4. Conservación de los gránulos de kéfir.....	30
2.2.5. Cuidados del kéfir.....	33
2.2.6. Esterilización.....	33
2.2.7. Biorreactor.....	35
2.2.8. Tipos de biorreactores.....	35
2.2.9. Modo de operación.....	40
2.3. Marco conceptual.....	44
2.4. Definición de términos básicos.....	48
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	50
3.1. Hipótesis.....	50
3.1.1. Hipótesis General.....	50
3.1.2. Hipótesis específicas.....	50
3.2. Definición conceptual de variables.....	51
3.2.1. Operacionalización de variables(dimensiones, indicadores y métodos)...	52
IV. DISEÑO METODOLÓGICO.....	53
4.1 Tipo y diseño de la investigación.....	53

4.1.1. Diseño de la investigación.....	53
4.2. Método de la investigación.....	54
4.3. Población y muestra.....	54
4.4. Lugar de estudio y período desarrollado.....	55
4.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos.....	55
4.5.1. Procedimiento Experimental.....	55
4.6. Análisis y procesamientos de datos.....	73
V. RESULTADOS.....	74
5.1. Resultados descriptivos.....	74
5.2. Resultados inferenciales.....	76
5.3. Otro tipo de resultados.....	76
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	77
6.1. Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados.....	77
6.2. Contrastación de los resultados con otros estudios similares.....	77
6.3. Responsabilidad ética de acuerdo a los reglamentos vigentes.....	78
CONCLUSIONES.....	79
RECOMENDACIONES .....	80



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....81

ANEXOS.....86

## TABLAS DE CONTENIDO

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición del kéfir-----	25
Tabla 2 Principales grupos de bacterias lácticas presentes en el kéfir -----	26
Tabla 3 Evolución de la concentración en los fermentadores -----	38
Tabla 4 Principales características del funcionamiento de fermentadores-----	39
Tabla 5 Modelos para describir cinéticas de crecimiento-----	47
Tabla 6 Parámetros de modelamiento-----	59
Tabla 7 Dimensiones de placas deflectoras (en mm)-----	71
Tabla 8 Resultado del diseño del biorreactor -----	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura macroscópica de los gránulos de kéfir .....	24
Figura 2 Biorreactor de tanque agitado mecánicamente .....	36
Figura 3 Definición de variables .....	51
Figura 4 Agitadores para líquido de viscosidad moderada de tres palas.....	67
Figura 5 Placas deflectores distribuidas en estanque .....	70

## RESUMEN

Se eligió la tecnología del método artesanal par la producción del kéfir de leche considerando nuestro pequeño volumen de producción (100 L).

El modelo matemático que mejor describía la cinética fue el de Baranyi-Roberts

Con base a los fundamentos y procedimientos de diseño del biorreactor y su sistema de agitación se necesitó la utilización del método matemático para determinar su capacidad y la velocidad de agitación.

Los resultados obtenidos respecto del biorreactor son los siguientes: volumen del reactor  $0.115 \text{ m}^3$  con un diámetro interno de 0,42 m y una altura de 0,84 m, altura del líquido 0,72 m.

Los resultados obtenidos respecto del sistema de agitación son los siguientes: longitud del brazo agitador 0,26 m, diámetro del eje 0,026 m, diámetro del rodete 0,315 m y velocidad de agitación 90 rpm.

**Palabra clave:** kéfir, biorreactor, bacterias ácido lácticas, fermentación, inoculo, biomasa.

## ABSTRACT

The artisan method technology was chosen for the production of milk kefir considering our small production volume (100 L).

The mathematical model that best described kinetics was the Baranyi-Roberts model.

Based on the fundamentals and design procedures of the bioreactor and its stirring system, the use of mathematical method was required to determine its stirring capacity and speed.

The results obtained with respect to the bioreactor are the following: reactor volume 0.115 m<sup>3</sup> with an internal diameter of 0.42 m and a height of 0.84 m, liquid height 0.72 m.

The results obtained with respect to the stirring system are the following: stirring arm length 0.26 m, shaft diameter 0.026 m, impeller diameter 0.315 m and stirring speed 90 rpm.

Keyword: kefir, bioreactor, lactic acid bacteria, fermentation, inoculum, biomass.

## INTRODUCCIÓN

El kéfir es una bebida fermentada obtenida de una simbiosis entre bacterias lácticas y levadura. Para la obtención de esta bebida se utilizó los gránulos de kéfir que fueron inoculados en leche (UHT). El consumo de esta bebida tiene beneficios para la salud como reducción de los niveles de colesterol, equilibrio de la microbiota intestinal, un bajo grado de intolerancia a la lactosa.

En la actualidad, el uso de los microorganismos con fines bioterapéuticos está cobrando auge. Una de las terapias más extendidas es el empleo de microorganismos para el tratamiento de patologías del tracto digestivo y se destaca, entre ellos los microorganismos con acción probiótica. Se define como producto probiótico a un complemento alimenticio a base de organismos vivos y vitales que producen efectos beneficios sobre el organismo, mejorando el equilibrio microbiano intestinal (Mateu, 2006).

Las fermentaciones son procesos metabólicos de levaduras y de varias bacterias que transforman compuestos químicos orgánicos, principalmente azúcar, en otras sustancias orgánicas más simples como etanol, ácido láctico y ácido butírico. Los procesos de fermentación han sido usados por el hombre desde hace miles de años, con el fin de preservar los alimentos y para producir bebidas, texturas y aromas específicos (Bai, 2009).

Para su elaboración se puede usar diferentes tipos de leche: leche de camella, leche de yegua, leche de cabra y leche de vaca. Se conoce tres tipos de kéfir según

el tipo de gránulo de kéfir que se utilice: de leche, de agua y de kombucha, siendo el más divulgado el kéfir de leche. No obstante, poco a poco empiezan a aparecer empresas que se dedican a la comercialización de los gránulos de kéfir modificando su estructura molecular.

Hoy en día su producción es artesanal, aunque también se produce comercialmente en otras partes del mundo.

Al consumo de kéfir se ha asociado varias propiedades promotoras de la salud como los efectos antimicrobianos, antitumorales, inmunológicos e hipocolesterolemicos (Romanin, 2010).

El biorreactor y su sistema de agitación son piezas claves y centrales de estos procesos biotecnológicos. Es por ello que en esta tesis tiene como objetivo el diseño de un biorreactor para la producción de kéfir de leche a nivel banco.

# **I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

## **1.1. Descripción de la realidad problemática**

La demanda de alimentos funcionales probióticos está creciendo rápidamente debido a la mayor conciencia sobre el valor de estos productos. Así, los productos lácteos fermentados con bacterias del ácido láctico, como las cepas *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, fortificados con azúcar, han emergido en el mercado alimentario en la última década. El mercado mundial de alimentos y bebidas funcionales ha crecido de US \$33 mil millones en 2000 a US\$ 129 mil millones en 2015 y se espera el alcance los US \$255 mil millones en 2024 (Research, Markets, 2017).

Antes de la era moderna industrial existían pocos productos lácteos. Se desconocían los métodos para conservar la totalidad de los componentes de la leche, y solamente los elementos insolubles (caseína y grasa) podían conservarse, pero la parte soluble se despreciaba o se utilizaba mal (descripción del problema). La conservación de una parte importante de la leche producida en la “regiones lecheras” es una necesidad económica y social; ello permite transportes en el tiempo y en el espacio y, como consecuencia, la regulación de los mercados y la posibilidad de aprovisionar las zonas deficitarias. Esta conservación puede realizarse, hoy en día, por diversos métodos que permiten conservar casi indefinidamente la leche íntegra o privada de su agua de constitución (Alais, 2013, p.67)

El conocimiento actual del kéfir va desde criterios generales hasta específicos. Considerando lo primero nos permite opinar que es un alimento probiótico debido



a que contribuye al equilibrio de la flora bacteriana intestinal y potencia al sistema inmune.

Dependiendo del lugar, este producto presenta características organolépticas distintivas proporcionadas por el tipo de microorganismos asociados y la calidad de la leche utilizada.

Los gránulos de kéfir están en continuo crecimiento por ser microorganismos vivos; los nódulos que se crean, se parten por gemación y poco a poco duplican su tamaño necesitando más aporte energético y espacio.

Para la elaboración a escala comercial se necesita de cultivos seleccionados y eficientes que permitan controlar la microflora involucrada para obtener producción de calidad y estandarizada; así como extender la vida útil del producto y facilitar los aspectos nutrimentales, considerando altos valores de bacterias viables, además de buenas propiedades químicas y organolépticas.

El proceso de producción consta de 5 pasos los cuales se explican a continuación: primero, se carga el biorreactor con los gránulos de kéfir y la leche se deja que opere aproximadamente 12 horas; segundo, transcurrido el tiempo se escurre los gránulos del kéfir a través de un proceso de filtración, este producto es el kéfir que luego pasará a un determinado acondicionamiento para mejorar su sabor; tercero, seguidamente se lavan los gránulos de kéfir con agua hervida; cuarto, se secan los gránulos y quinto, se devuelve al biorreactor, al cual se le agregará nueva cantidad de leche.

Diseñar un biorreactor no es un trabajo sencillo pues está basado en principios científicos y de ingeniería y en muchas reglas empíricas. La disparidad de requerimientos multiplica las opciones disponibles a nivel de diseño y

funcionamiento. Todavía no existen procedimientos estandarizados para el diseño de biorreactores que cubran todos los aspectos del recipiente y de su operación.

Los aspectos específicos del reactor y su operación incluyen varias decisiones críticas. Las decisiones tomadas en el diseño del biorreactor tienen un efecto considerable sobre el rendimiento global del proceso. El conocimiento de la cinética microbiana es esencial para comprender como funcionan los fermentadores, así como los balances de materia y energía, la mezcla, la transferencia de materia y la transmisión de calor. (Doran 1998, p. 349).

Por tanto, ante una escasa investigación acerca del diseño de biorreactores para kéfir, existe la necesidad de desarrollar el diseño de un biorreactor experimental para la producción de kéfir a nivel banco.

## **1.2 Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema general**

¿Cómo se va diseñar el biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche?

### **1.2.2. Problemas específicos**

a) ¿Cómo seleccionar y desarrollar la tecnología que permitirá la producción de kéfir de leche?

b) ¿Cómo utilizar un modelo matemático adecuado de la cinética de reacción microbiana para la producción de kéfir de leche?

c) ¿Los fundamentos y los procedimientos del diseño de biorreactores permitirán diseñar el biorreactor para la producción de kéfir de leche?

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo general**

Diseñar un biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche.

### **1.3.2. Objetivos específicos**

- a) Seleccionar la tecnología que permitirá la producción de kéfir de leche.
- b) Utilizar un modelo matemático de la cinética de reacción microbiana para la producción de kéfir de leche.
- c) Analizar los fundamentos y los procedimientos de diseño del biorreactor para la producción de kéfir de leche.

## **1.4. Límites de investigación**

Para el trabajo de investigación, los principales límites de investigación fueron:

- a) Teórica: Durante el proceso de investigación se usarán teorías y enfoques sobre el proceso de elaboración de leche de kéfir y el diseño del biorreactor, en artículos científicos, revistas especializadas que son escasas y tesis que ayuden a explicar las bases teóricas.
- b) Temporal: El presente trabajo de investigación es de tipo longitudinal.
- c) Espacial: La unidad de análisis se desarrolló en la Universidad Nacional del Callao, situada en el distrito de Bellavista, Callao – Perú.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

#### 2.1.1. Antecedentes Internacionales

Cejudo y Bautista (2019) publican la investigación en la Revista Tecnológica Agrobioalimentaria titulada la investigación “Producción de leche Bulgarada en un biorreactor aerobio con cultivo inmóvil de kéfir”, han investigado un biorreactor con cultivo inmovilizado para la elaboración de una bebida fermentada a base de leche, saborizada con chilacayote (*Cucúrbita ficifolia*). El biorreactor aerobio con cultivo inmóvil, conteniendo un medio de leche pasteurizada entera, se diseñó el fermentador agitando manualmente cada 4 horas analizándose después de 32 horas con 10 g de inóculo por litro, tomando alícuotas cada 4 horas y determinando los análisis fisicoquímicos de las muestras (biomasa, pH, acidez titulable, sólidos, densidad, etc. Se obtuvo una bebida fermentada de kéfir ligeramente carbonatada en leche entera. Se concluye con un aumento de biomasa de 14%, alcanzando una concentración final de ácido láctico de 7g/L, pH de  $4.5 \pm 0.05$  y una producción máxima de etanol de 0.78g/L.

Tavares et al. (2018), publica la investigación titulada “Caracterización físico-química y análisis microbiológico de le leche fermentada por kéfir”, enfatizan que el principal objetivo es evaluar el estudio dirigido a las características fisicoquímicas y microbiológicas de kéfir. En el método se cuantificaron los microorganismos mediante la técnica de enchapado en la superficie, ácido láctico y lactosa y el pH. Sus resultados fueron en el recuento microbiológico un promedio de  $7.9 \log_{10} \text{UFC mL}^{-1}$  para bacterias mesófilas y  $7.1 \log_{10} \text{UFC mL}^{-1}$

para levadura total, dentro de las 24 horas posteriores a la fermentación. Las conclusiones finales es que las características fisicoquímicas y microbiológicas encontradas en el kéfir están de acuerdo con la legislación vigente, que demuestra que el alimento es apto para el consumo humano y con bajo grado de lactosa. Los valores mínimos requeridos por la regulación brasileña para las bacterias del ácido láctico y levaduras específicas también se vieron afectadas.

Salas y Valadez (2014), en la investigación de: "Caracterización e identificación molecular de bacterias aisladas de kéfir", encontraron que existe gran interés en industrializar el kéfir de forma estandarizada debido a las propiedades nutricionales que ofrece este producto lácteo por lo que fue necesario caracterizar e identificar molecularmente un grupo de bacterias aisladas de kéfir. Sus variables estudiadas fueron los marcadores genético- moleculares gen 16S de rDNA. Los métodos utilizados resultaron adecuados para caracterizar e identificar las bacterias ácido- lácticas. Encontrando así que el kéfir producido a partir de la extracción de bacterias ácido-lácticas alcanza un pH entre 4,9 a 6,1.

Tuğba et al. (2013) investigación desarrollada: "Efectos de diferentes parámetros de fermentación sobre las características de calidad del kéfir", han investigado los efectos de diferentes parámetros de fermentación en el kéfir. Las muestras de kéfir se produjeron utilizando granos de kéfir como cultivo iniciador de kéfir natural.

Las muestras de kéfir se utilizaron los gránulos de kéfir las muestras y la fermentación fue llevada en condiciones en atmósfera normal. Se determinó parámetros microbiológicos (lactobacilos, lactococos, y levaduras), químico (pH, ácido láctico, sólidos totales, proteína, etanol, exopolisacáridos en un tiempo de

21 días. Se concluye que las muestras de kéfir producidas con granos de kéfir y cultivo iniciador de kéfir natural sin granos tenía química similar, microbiológica, reológica y sensorial. El uso de cultivo iniciador de kéfir sin granos es más fácil y aplicable que el mantenimiento de granos de kéfir a escala industrial.

Lopitz et al. (2006) en la investigación de: “Kéfir: una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras con propiedades saludables”.

Afirman que el kéfir es una bebida láctea fermentada. Los gránulos de kéfir, son comunidades de microorganismos que se agrupan en un matriz polisacárido denominada kefirano, son los responsables de esta fermentación. Estos gránulos son un ejemplo de simbiosis entre levaduras y bacterias y se han utilizado a través del tiempo para producir kéfir, que es consumido por todo el mundo a pesar de su origen caucásico. En esa relación simbiótica, que son los gránulos de kéfir, se han aislado e identificado una amplia variedad de especies microbianas que comprenden levaduras y bacterias. El kéfir es un alimento probiótico. Los probióticos han demostrado ser beneficiosos para la salud, siendo de gran interés para la industria alimentaria en la actualidad. Según se afirma, el kéfir ha mostrado actividades antibacterianas, antifúngicas y antitumorales, entre otros atributos beneficiosos. Este trabajo incluye una revisión crítica de la composición microbiológica del kéfir junto con sus propiedades beneficiosas para la salud humana.

Rodríguez, Cabrera y Valencia (2003) en la investigación de: “Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo”; enfatizó que la importancia de la instrumentación de un biorreactor prototipo radica en la necesidad de tener en los cultivos un control que permita optimizar

el proceso. La estrategia de control comienza con la medición de las variables que proveen un ambiente adecuado en un proceso de fermentación. El diseño y construcción de los elementos necesarios para el monitoreo de las variables del biorreactor, requirieron conocimientos de las necesidades del biorreactor y su operación específica, así como de los circuitos electrónicos involucrados en los dispositivos de medición. Por último, se llevó a cabo la construcción de la estación de trabajo tomando en cuenta las características de funcionalidad, dimensión, transportación del prototipo. De esta manera, se logró controlar un proceso fermentativo en un biorreactor prototipo con instrumentos de diseño y construcción propios. La importancia de todo esto radica en que nos permite utilizar medios electrónicos accesibles para el sensado de las variables implicadas en los procesos biotecnológicos de una manera rápida y económica.

### **2.1.2. Antecedentes Nacionales**

Ramírez, H. (2020) en la tesis titulada: “Actividad metabólica, viabilidad y exopolisacáridos de bacterias lácticas de granos de kéfir liofilizado con potencial tecnológico en la región central”, tuvo como objetivo la evaluación de la actividad metabólica, viabilidad y exopolisacáridos de bacterias lácticas de granos de kéfir liofilizados. El método consistía en conseguir granos de kéfir liofilizados con crioprotectores y concentraciones de (0.20 y 0. 50%). El método se realizó mediante el recuento de las bacterias ácido lácticas, Hongos y levaduras; mientras en los exopolisacáridos mediante el método de la biomasa. Se trabajó al 3% m/v de granos de kéfir liofilizados, llegando a la conclusión que se puede desarrollar una bebida láctea fermentada y entender que existen diferencias significativas en el perfil sensorial, fisicoquímico y microbiológico según el tipo

de cultivo escogido. Los valores de pH y acidez cambiaron durante el tiempo de almacenamiento y según el tipo de cultivo empleado.

Arévalo y Arias (2014) en la investigación de: “Estudio de la velocidad de agitación en la producción de biomasa de granos de kéfir”; notaron que el lactosuero es un desecho industrial con alto poder de contaminación que exige una demanda bioquímica entre 30000 y 50000 mg/L. Decidieron estudiar de qué manera la velocidad de agitación afecta el crecimiento de los granos de kéfir en una mezcla de suero de leche y melaza de caña. Determinaron si el crecimiento óptimo de los mencionados granos se da a velocidad de agitación de flujo laminar, de transición o turbulento, tomando en consideración el número de Reynolds. Se tomaron como variables de estudio la velocidad de agitación en el proceso de fermentación y el tipo de flujo, encontrando así que para, que la producción de biomasa sea óptima los parámetros cinéticos de fermentación (velocidad de agitación y tipo de flujo) deben ser adecuadamente controlados en la fermentación.

Sus resultados fueron que sin agitación o por encima de 300 rpm los granos se encuentran sin consistencia. Por el contrario, si estos se encuentran en el rango de [60-240] rpm los granos presentan color blanco y consistencia. Por tanto, el desarrollo o incremento de gránulos de kéfir puede ser en flujo laminar o turbulento, escogiendo el flujo laminar por fines económicos y para no causar daños a los gránulos.

Arévalo y Quispe (2008) en su investigación de: “Control y regulación del pH en una fermentación láctica utilizando carbonato de calcio como regulador y microbiota de granos de kéfir como agente biológico”; indica que muchos



procesos biotecnológicos son afectados debido a que los parámetros de fermentación, por ejemplo, pH, no son los adecuados porque son difíciles de controlar o son costosos. Sus objetivos fueron demostrar que el carbonato de calcio puede regular un exceso de acidez en una fermentación láctica y a su vez reflejarlo en un mayor rendimiento de biomasa proveniente del microbiota de los granos de Kéfir y determinar el pH de equilibrio que se establece en el medio de cultivo durante la fermentación, debido a la interacción entre los metabolitos de los granos de kéfir y el carbonato.

Postularon que es posible controlar el pH de una fermentación láctica utilizando granos de kéfir como agente biológico y carbonato de calcio como regulador. Sus resultados fueron que, sin adición de carbonato, el pH ascendió a 3.27; con  $\text{CaCO}_3$  podía ser controlado en un rango de 3.92 a 4.26. Por tanto, el  $\text{CaCO}_3$  es un buen regulador de pH en agentes biológicos como es el kéfir.

Arévalo y Arias (2007) de la investigación titulada, "Estudio Comparativo del efecto de las temperaturas constante y variable ambiente en la producción de biomasa proveniente de la microbiota del grano de kéfir".

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de la temperatura en la fermentación y producción de biomasa proveniente de la microbiota de kéfir utilizando leche entera como sustrato. Se empleó inóculo a una concentración de 5% y se dejó fermentar por 4 ciclos de fermentación a 24 horas por ciclo, para evaluar a dos temperaturas dadas: constante a 24 °C y variable entre el intervalo de 19 y 26°C. Los resultados demostraron que los granos de kéfir obtenidos a temperatura variable de fermentación a temperatura entre 19 y 26°C, resulto tener mayor consistencia que los granos fermentados a temperatura constante

de 24°C. Se concluyó que en el Perú donde no se presentan temperaturas extremas, la fermentación de los granos de kéfir con el propósito de producir kéfir y biomasa a temperaturas ambiente, es viable y de gran importancia.

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Proceso de fermentación**

La palabra fermentación ha sufrido evoluciones en sí misma. El término fue empleado para describir la condición de burbujeo o ebullición vista en la producción de vino, antes de que las levaduras fueran descubiertas (Neyra, 2012, pág. 123) Por lo que la fermentación es:

- a) Proceso metabólico llevado a cabo por microorganismos, bacterias y levaduras bajo condiciones aeróbicas y anaerobias obteniendo energía y teniendo características físico-químicas controladas.
- b) Es un proceso en el que se potencia deliberadamente el crecimiento de los microorganismos que consumen una cantidad de sustrato y enriquecen, por medio del cultivo los productos de su metabolismo.
- c) El proceso de fermentación es producido por acción de las enzimas cambios químicos en las sustancias orgánicas. (Tames,1987, p.88)

Se tienen los siguientes tipos de fermentación:

- a) Fermentación alcohólica: Las levaduras son los convertidores de aldehydos a alcoholes más eficientes. La levadura *Saccharomyces ellipsoideus*, es de gran importancia industrial en las fermentaciones alcohólicas. La reacción de azúcar a alcohol tiene muchos pasos.

b) Fermentación acética: Resulta de la oxidación del alcohol por la bacteria del vinagre en presencia del oxígeno del aire: Esta bacteria, a diferencia de las levaduras productoras de alcohol, requiere un suministro generoso de oxígeno para su crecimiento y actividad.

c) Fermentación láctica: Son de gran importancia en la conservación de alimentos. La fermentación de ácido láctico es eficiente y la fermentación de los organismos es de crecimiento rápido. Las inoculaciones naturales son tales, que en un medio adecuado la bacteria del ácido dominará, por ejemplo, la acidificación de la leche.

d) Fermentación cítrica: La fermentación más común es aquella en que ocurre una oxidación parcial del azúcar. En este caso el azúcar puede ser convertido en ácido. Finalmente, el ácido puede ser oxidado para dar bióxido de carbono y agua, si se permite que ocurra. Por ejemplo, algunos mohos son usados en la producción de ácido cítrico de soluciones de azúcar.

e) Fermentación butírica: Son menos útiles en la conservación de alimentos. Los organismos son anaeróbicos e imparten sabores y olores indeseables a los alimentos. Los organismos anaeróbicos capaces de infectar al hombre causándole enfermedades son comúnmente fermentadores butíricos. Para llevar a cabo la fermentación se requiere conocer el sustrato y microorganismo idóneo y conocer las características físico-químicas del sustrato. (Tames, 1987, p.76).

### **2.2.2. Kéfir**

El kéfir es una bebida láctea fermentada, un alimento probiótico, Salas J. (2006, págs. 67-74). Los gránulos de kéfir, son comunidades de microorganismos que se agrupan en un matriz polisacárido denominada kefirano y son los

responsables de la fermentación. Estos gránulos son un ejemplo de simbiosis entre levaduras y bacterias. Los gránulos de kéfir son consorcios simbióticos de bacterias ácido lácticas y levaduras, estos se obtienen a partir de la proliferación de gránulos preformados (Garrote,1998, p.143), que se agrupan en una matriz polisacárida denominada kefirano (kéfir). Garaizar, J. (2006, págs. 67-74), afirma que el kéfir es una bebida láctea fermentada, un alimento probiótico.

Kefiran o kefirano es el nombre que recibe un polisacárido gelatinoso soluble en agua de color amarillo claro o amarillo pálido que desprende los granos de kéfir. Se compone de los monosacáridos glucosa y galactosa, en una proporción 1:1 y conforma la matriz del gránulo de kéfir.

Al ser considerado un alimento probiótico, su ingesta ayuda al buen funcionamiento del intestino humano por el incremento de la flora benéfica. (Salas y Valadez, 2014, p.12).

El kéfir, está compuesto principalmente de bacterias ácido-lácticas y levaduras. Las características organolépticas que las distinguen están en función del lugar o región donde se encuentre de tal forma que el producto está en función del tipo de microorganismos asociados y por la calidad de la leche utilizada.

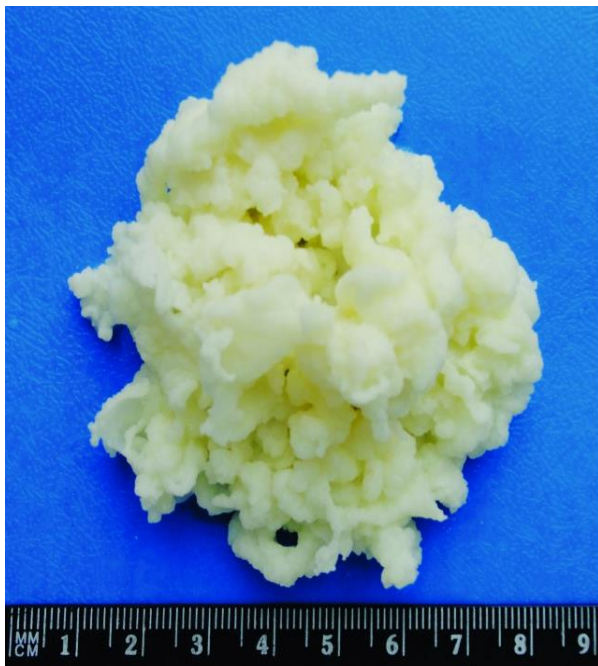
Existen diversos tipos de kéfir, esto dependerá del tipo de kefirano que se emplee: kefirano de agua, kombucha o leche; siendo el más comercializado el kéfir de leche por su sabor característico.

En la Figura 1 se observa la estructura de los gránulos de kéfir, estos ayudan a la activación de la fermentación del kéfir de leche.

Su composición del kéfir se detalla en la Tabla 1 en los diferentes tipos de leche y después tendremos la Tabla 2, el cual nos indica que grupos de bacterias presenta el kéfir.

**Figura 1**

*Estructura macroscópica de los gránulos de kéfir*



Fuente: Leite (2013).

**Tabla 1***Composición del Kéfir*

Contenido	Kéfir	Leche		Yogur
		Entera	Descremada	
Kcal.	61	64	35	61
Proteínas	3,3	3,3	3,5	3,3
Lípidos (g)	3,5	3,5	0,1	3,5
Glúcidos (g)	4	4,8	4,9	4
Agua (g)	87,5	87,5	90,58	7,5
Colesterol (mg)	11	11	---	11
Sodio (mg)	48	48	50	48
Potasio (mg)	157	157	163	157
Calcio (mg)	120	120	125	120
Fósforo (mg)	92	92	96	92
Magnesio (mg)	12	12	12	12
Hierro (mg)	0,1	0,1	0,1	0,1
Vitamina A (mg)	31	31	1	31
Vitamina E (mg)	0,2	0,2	---	0,2
Vitamina B1 (mg)	0,03	0,03	0,03	0,03
Vitamina B2 (mg)	0,18	0,18	0,19	0,18
Vitamina B3 (mg)	0,1	0,1	0,1	0,1
Vitamina B6 (mg)	0,05	0,05	0,05	0,05
Vitamina C (mg)	1	1	1	1

Fuente: Gálvez (2012)

**Tabla 2***Principales Grupos de Bacterias Lácticas presentes en el kéfir*

<b>Género</b>	<b>Especies más frecuentes</b>	<b>Características</b>
Lactobacilos	<i>Lb.brevis, Lb.Kéfir</i>  <i>Lb.casei, Lb.paracasei sp.</i> <i>Paracasei, Lb.plantarum, Lb.</i> <i>acidophilus, Lb. delbrueckii sp.</i> <i>Bulgaricus, Lb. Kefiranofaciens</i>	Heterofermentativos  fermentativos en la leche fermentada.  Predomina en los granos de kéfir
Lactococos	<i>Lc. lactis sp. lactis,</i> <i>Lc. Lactis sp. lactis biovar diacetylactis,</i> <i>Lc.lactis sp.Cremoris</i>	Acidifica rápidamente durante las primeras horas de fermentación.
Streptococcus	<i>S.thermophilus</i>	Raramente encontrado.
Leuconostoc	<i>Ln.mesenteroides sp.mesenteroides, Ln</i> <i>mesenteroides sp.dextranicum, Ln</i> <i>mesenteroides sp. Cremoris, Ln.Lactis</i>	Contribuye al sabor del kéfir.
Acetobacter	<i>Acetobacter aceti,</i>	Su rol principal es mantener en simbiosis la microflora de los granos del kéfir. Incrementa la viscosidad del kéfir.

Fuente: Ruiz (2017)

### **2.2.3. Proceso de fermentación del kéfir**

En el intercambio entre la leche y el kéfir se produce una doble fermentación en la que se transforman los azúcares y proteínas de la leche en: Gas carbónico  $\text{CO}_2$  y etanol (gracias a la acción de las levaduras) y ácido acético.

#### **A) Fermentación láctica:**

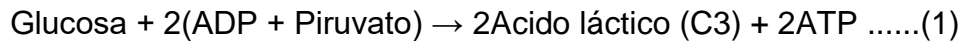
Muchos lactobacilos producen diacetilo, un aroma deseable en gran variedad de productos de fermentación. El diacetilo es el responsable del refrescante sabor de la leche fermentada con kéfir.

El ácido láctico es producido por la acción de las bacterias lácticas que reducen y transforman la indigesta lactosa (el azúcar de la leche) en ácido láctico, responsable de su acidez (entre 4,2 y 4,6 de pH). Esto hace al kéfir mucho más asimilable que la leche y que puedan tomarlo los intolerantes a la lactosa. En la coagulación de las proteínas, se transforma la albúmina y la caseína (fermentación hidro-alcohólica).

El proceso de fermentación láctica se desarrolla en el citosol de la célula, en la cual se oxida la glucosa para obtener energía y el ácido láctico es el desecho. Una ruta para el metabolismo del piruvato (continuación de la glucólisis) es su reducción al lactato a través de la fermentación láctica. La glucólisis necesita de glucosa y de la coenzima  $\text{NAD}^+$  (nicotinamida adenina dinucleótido) para llevarse a cabo, y cuando no hay oxígeno, el  $\text{NADH}$  no puede ser reoxidado a  $\text{NAD}^+$  (y se detiene la glucólisis), siendo este último el aceptor de electrones imprescindible para la oxidación del piruvato. En estas condiciones el piruvato se reduce a lactato, aceptando los electrones del  $\text{NADH}$  y regenerando así el



NAD<sup>+</sup> necesario para continuar la glucólisis y obtener energía (ATP's). Este tipo de fermentación es responsable de la elaboración de productos lácteos acidificados ya que el ácido láctico tiene excelentes propiedades conservantes de los alimentos.



Las bacterias que se encuentran en la fermentación láctica son (Brock, 1991:23):  
Lactobacillus Bulgaricus, Streptococcus Lactis y Candida Spp

De conceptos generales, la presencia del ácido láctico, producido durante la fermentación láctica es responsable del sabor amargo, y de mejorar la estabilidad y seguridad microbiológica del alimento. Este ácido láctico fermentado es responsable del sabor amargo de productos lácteos como el queso, yogurt y el kéfir.

La posibilidad de controlar el efecto negativo del exceso de acidez que se produce en las fermentaciones lácticas es mediante la utilización del carbonato de calcio como regulador y la microbiota de los granos de kéfir como agente biológico (Arévalo y Quispe, 2008, p. 54).

El exceso de acidez puede hacer que los procesos bioquímicos sean inhibidos o se vean afectados por la puesta en marcha, por parte de los microorganismos, de los mecanismos de retroalimentación negativa o feedback negativo.

En esta reacción el NADH se oxida y el ácido pirúvico se reduce transformándose en ácido láctico. Ocurre en algunas bacterias y gracias a este proceso obtenemos productos como el yogurt, queso, etc.

## **B) Fermentación alcohólica**

El kéfir tiene un sabor efervescente natural, refrescante, ácido y ligeramente agrio, con un suave aroma que recuerda a la levadura fresca. Contiene entre 0.08 a 2% de alcohol, además de otros compuestos aromáticos que contribuyen a su sabor único y aroma agradable, especial del kéfir.

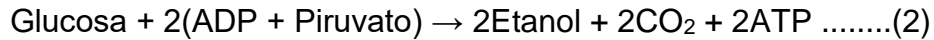
La fermentación alcohólica al igual que la láctica tiene como propósito obtener energía. (Bernard Atkinson, 1986, p.44) menciona que la fermentación alcohólica se lleva a cabo anaeróbicamente y consecuentemente el crecimiento microbiano es relativamente lento; la producción de dióxido de carbono gaseoso altera el modelo de flujo e incrementa la extensión de la mezcla y de la atrición o rozamiento de las partículas. La fermentación alcohólica convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de etanol y dos de CO<sub>2</sub>.

La glucosa (en la glucólisis) forma dos moléculas de ácido pirúvico (piruvato) que se oxidan nuevamente para obtener un acetaldehído y como producto residual alcohol etílico (etanol) y CO<sub>2</sub>.

La hexosa es atacada por las enzimas de la glucólisis que la convierten en piurivato; este es descarboxilado (oxidado) por la enzima piruvato descarboxilasa, para producir acetaldehído y CO<sub>2</sub>.

Finalmente, la deshidrogenasa alcohólica convierte al acetaldehído en etanol, es una reacción que utiliza una molécula de NADH.

En este tipo de fermentación el aceptor final de electrones es el acetaldehído. (Guerra, 2014).



#### **2.2.4. Conservación de los gránulos de kéfir**

Existen diversas maneras de conservar los gránulos de kéfir y reactivarlos posteriormente. Cuando se usa el refrigerador generalmente los gránulos se almacenan en un recipiente de vidrio con suficiente alimento que puede ser leche o agua. Para reactivar el kéfir de nuevo hay que dejar que se temple a temperatura ambiente, tanto el cultivo como la leche que se le agregue.

a) En leche de 4 a 5 días: Debemos dejar el recipiente con la leche y los nódulos en el refrigerador y así el proceso de fermentación es más lento. Luego deberemos colarlo y proceder como siempre.

b) En agua por una semana: Se lavan bien los nódulos con agua fría y se guardan en un recipiente de cristal cubiertos con agua fría sin cloro. Luego se ponen en el refrigerador a 4°C o 5°C. De esta manera conservan su vitalidad durante una semana. Después de este tiempo la van perdiendo, pero al volver a utilizarlos su comportamiento es más lento y suelen recuperarse con el tiempo. En este caso es aconsejable dejarlos más tiempo con la leche, colocar el recipiente en un lugar más cálido o mezclarlos con poca cantidad de leche. De esta forma al cabo de un tiempo volverán a recuperarse.

También los gránulos de kéfir pueden guardarse secos. Si los nódulos se secan correctamente se oscurecen un poco pero no deben ponerse marrones o con trazas verdes. Una vez deshidratados parecen granos terrosos. Se lavan con agua fresca varias veces y se escurren. Se extienden sobre un paño de algodón dentro de una cajita de cartón o similar, tapándolos con un pliegue del mismo paño o con otro. Se dejan secar en un lugar ventilado (puede utilizarse un ventilador si fuese necesario) a la temperatura ambiente de la casa durante 36 o 48 horas dependiendo de la humedad de la habitación y la temperatura. Se remueven de vez en cuando hasta que queden duros y deshidratados por completo. Luego se envuelven bien en papel y se guardan en un recipiente hermético, en un lugar seco y fresco. Si los nódulos se han desecado correctamente se mantienen activos unos 12 ó 18 meses. A partir de los tres meses de almacenamiento, tardan un poco más en reactivarse.

Reactivación de nódulos secos: La utilización de leche cruda para la rehidratación y reactivación de los nódulos secos es muy recomendable, porque se consigue una mejor reconstitución de los microorganismos del kéfir que pueden haber sucumbido a la desecación. Para empezar, se ponen en un tarro con la adición de leche fresca. Activar renovando a diario la leche después de filtrar los nódulos. No beber esta leche hasta que produzca un aroma amargo y limpio. La reconstitución de los nódulos secos puede durar entre cuatro días y en algunos casos una semana y media. Cuando la leche comienza a coagular en el plazo de 24 horas, produciendo un aroma amargo y limpio, como a levadura fresca, los nódulos se han reactivado.

Al activar los nódulos deshidratados de kéfir los primeros días la leche pasará a través de algunas etapas inusuales, con respecto a su aspecto y aroma. La leche producirá inicialmente una actividad de la levadura, como "espuma" que se forma en la superficie de la leche. La actividad de la levadura puede alcanzar un pico después de tres a 5 días, entonces comienza a desplomarse mientras que las tandas consecutivas se cultivan bien. En las tandas siguientes, la microflora debe encontrar un equilibrio entre las bacterias y levaduras, que los nódulos de kéfir alcanzan normalmente. Esto puede durar entre una a dos semanas. La tasa de crecimiento puede no ser evidente, en algunos casos, hasta la tercera semana. Los nódulos deben de ser más blancos al finalizar cada tanda.

Cualquier gránulo amarillo o amarillo-rosado-marrón que no tenga una característica elástica, se debe retirar después de una semana. Éstos son los nódulos infecundos (no crecerán), la cantidad de estos es determinada por las condiciones de almacenaje y el tiempo que lleven los nódulos deshidratados. Los nódulos infecundos se desintegran. Cuando estos son exprimidos entre dos dedos limpios, tienen una textura blanda deshaciéndose en una pasta granulada. Mientras que son fecundos, los nódulos son blancos y elásticos con una sensación levemente fangosa (Kefiran).

Existen otros métodos para almacenar gránulos de kéfir. Los gránulos de kéfir se pueden poner en medios distintos a la leche, como la leche de soja o de otras semillas con contenido proteico, y conseguirán coagular las proteínas para que sean más digeribles. Aunque realmente no se trata de otros medios de intercambio para cultivar el kéfir sino más bien el aprovechamiento de los

excedentes para fermentar otros componentes. Al cambiar drásticamente el alimento del kéfir corremos el riesgo de que los nódulos se deterioren y pierdan su capacidad de crecimiento y a la larga nos podemos quedar sin kéfir. Una vez que los nódulos se han usado para fermentar otros productos no sería prudente volver a cultivarlos en leche.

#### **2.2.5. Cuidados del kéfir**

El polisacárido forma un gel soluble (Kefiran) de textura fangosa que puede confundirse por su aspecto con algo que parece estar malo o pasado. De hecho, esto no debe ser confundido con los productos de alimentación que se han pasado, y que pueden tener un aspecto similar y una textura fangosa sobre ellos. Esta sustancia es normal y sana.

La formación ligeramente mucosa en el nódulo de kéfir, que trasmite a la leche, tiene una calidad "limpia" que crea condiciones ideales para la colonización de bacterias amistosas en la flora intestinal. Usando menos proporción de leche en la obtención de kéfir, esta sustancia puede estar más concentrada en el kéfir terminado.

Este componente es el que da al kéfir su particular textura única, rica y cremosa y sólo los nódulos de kéfir pueden producirlo.

#### **2.2.6. Esterilización**

Lázaro (2013, págs.3-6) comenta que el diseño del fermentador deberá garantizar las condiciones de esterilidad, evitando la aparición de contaminación,

ya sea química o microbiológica. Para ello, la selección de materiales debe garantizar la inocuidad total, deben ser inertes químicamente y deben ser resistentes a las soluciones de lavado y los procesos de desinfección. El diseño de los equipos deberá garantizar la esterilidad del proceso y la selección de los accesorios, deberá permitir la operación en condiciones asépticas.

La esterilización en un fermentador es necesaria en varias fases del bioproceso.

En concreto se utiliza para:

- a) Asegurar que sólo nuestro producto está presente en el medio de producción
- b) Proteger el producto durante el proceso
- c) Proteger el producto después del proceso
- d) Proteger al paciente

El tipo de esterilización más frecuente se lleva a cabo mediante vapor puro.

Para verificar que la esterilización ha sido efectiva, deberán controlarse la temperatura y el tiempo, como parámetros físicos, así como factores biológicos como el bioburden presente antes de la esterilización ( $N_0$ ) o el tiempo en minutos requerido a una temperatura  $T$  para lograr un 90% de reducción de la población de microorganismos, también conocido como  $DT$ , siendo  $T$  normalmente  $121,1^{\circ}\text{C}$ .

Para conseguir los objetivos de la esterilización en sus diferentes aplicaciones, será imprescindible que el sistema permita esterilizaciones independientes de los distintos elementos que componen el sistema:

- a) Recipiente
- b) Cierre mecánico del agitador
- c) Filtros de venteo
- d) Filtros de aireación
- e) Sistemas de dosificación

### **2.2.7. Biorreactor**

Ruiz y colaboradores (2007, p.33) exponen que los Biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado “fermentador”), sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado.

### **2.2.8. Tipos de biorreactores**

Para Rodríguez (2003, p. 56) existen distintos tipos de biorreactores, pero básicamente tres:

- a) Biorreactor bucle agitado por aire (air-lift)
- b) Biorreactor de torre
- c) Biorreactor con agitación mecánica.

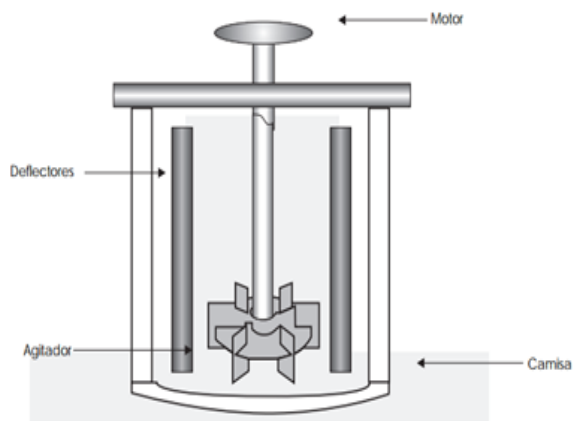


## Características del biorreactor

En la figura 2, encontramos un Biorreactor de Tanque Agitado mecánicamente por Rodríguez (2003: 57) comenta que los fermentadores con agitación básicamente consisten de un tubo cilíndrico con un agitador en el fondo o en la parte superior.

**Figura 2**

*Biorreactor de Tanque Agitado mecánicamente*



Fuente: Rodríguez (2003)

Estos biorreactores pueden variar en capacidad desde 1 litro hasta 30 litros.

En estos tipos de fermentadores es necesario un motor para poder llevar a cabo la agitación, el motor deberá generar la suficiente potencia para asegurar que el medio de cultivo en el fermentador permanezca como una mezcla homogénea, para un biorreactor de 20 litros un motor de 1 Kwatt es suficiente.

Estos biorreactores cuentan con un sistema de agitación mecánico, y el número de propelas tiene que ver con el tamaño del mismo, se coloca a lo largo del eje cilíndrico del reactor, lo cual favorece también el intercambio de calor. Asimismo,

cuentan con baffles (deflectores), los cuales son cortadores de corriente para prevenir la formación de vórtices en el medio. Generalmente se colocan cuatro deflectores.

Atkinson B. (1986, pp.44-45) muestra en la Tabla 3, la evolución de la concentración en los fermentadores, relacionando la forma en que la concentración: sustratos, masa microbiana y productos bioquímicos, varía en un fermentador con el tiempo y la posición, así como con el medio al que está expuesta la masa microbiana.

**Tabla 3**

*Evolución de la Concentración en los Fermentadores*

<b>Fermentador</b>	<b>Dependencia con el tiempo de las concentraciones de sustrato, masa microbiana y producto bioquímico</b>	<b>Variación de las concentraciones de sustrato y producto bioquímico con la posición</b>	<b>Variación de la concentración de masa microbiana con la posición</b>	<b>Evolución del medio en que se encuentra la masa microbiana</b>
Intermitente	Dependiente	Completamente mezclado (Ideal)	Completamente mezclado (Ideal)	Varía a lo largo de la fermentación Constante (todos los flóculos están expuestos al mismo medio durante todo el tiempo)
FCTA	Independiente	Completamente mezclado (Ideal)	Completamente mezclado (Ideal)	
Fermentador tubular que contiene “flóculos” microbianos	Independiente	Varía desde la entrada a la salida.	Varía desde la entrada a la salida.	Varía según asciende los flóculos por el fermentador
Fermentador tubular que contiene películas microbianas	En general independiente, aunque se pueden producir pequeñas acumulaciones de la película microbiana; esto afectará también a las concentraciones de sustrato y producto.	Varía desde la entrada a la salida.	Varía desde la entrada a la salida.	Constante (sin embargo, la película microbiana está expuesta a diferentes condiciones ambientales en puntos diferentes del fermentador)
Fermentador de lecho fluidizado	independiente	Varía desde la entrada a la salida.	Varía desde la entrada a la salida.	En general constante, aunque tiene lugar algún movimiento de flóculos. (los flóculos están sometidos a diferentes condiciones ambientales en los distintos puntos del fermentador)

Fuente: Atkinson (1986)

En la Tabla 4, se muestra las principales características de funcionamiento de fermentadores describe la capacidad de control para pH y temperatura, mayormente utilizados.

**Tabla 4**

*Principales Características del Funcionamiento de Fermentadores*

<b>Fermentador</b>	<b>Control de pH</b>	<b>Control de la temperatura</b>	<b>Característica de importancia industrial</b>	<b>Principales aplicaciones industriales</b>
Discontinuo	Es posible	Es posible	Mucha mano de obra	La mayor parte de las fermentaciones comerciales Depuración de aguas residuales;
FCTA	Es posible	Es posible	Caudal limitado por el arrastre	Producción de proteínas microbianas
Fermentador tubular conteniendo flóculos microbianos	Difícil de controlar salvo con gran recirculación	Es posible	Requiere una alimentación constante de microorganismos	
Fermentador tubular conteniendo películas microbianas	Difícil de controlar	Es posible	Difícil de controlar la retención de microorganismos dentro del fermentador	Depuración de aguas residuales; Producción de vinagre
Fermentador de lecho fluidizado	Difícil de controlar	Es posible	Caudal limitado por el arrastre	Producción de sidra y cerveza

Fuente: Atkinson (1986)

Lázaro considera que los principales factores que intervienen en el diseño y operación de fermentadores (Lázaro, 2013 p. 2) son:

- a) Requerimientos de los bioprocesos
- b) Características e impacto del diseño del proceso
- c) Geometría de un reactor y selección del agitador
- d) Selección y diseño de los accesorios
- e) CIP/SIP
- f) Optimización de costes de producción

#### **2.2.9. Modo de operación**

Las fermentaciones pueden ser clasificadas en función de su operatividad en 4 grandes grupos (Lázaro, 2013, p.3):

Operación discontinua (batch): Se trata de un sistema cerrado, en el que en el inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. En los procesos a escala industrial, se interrumpe la fermentación al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte (metabolitos secundarios). Se trata de un método robusto, bien conocido y que precisa de instalaciones simples. Sin embargo, la utilización de los medios materiales y humanos no es óptima.

Operación alimentada (fed-batch): Es básicamente similar a la fermentación discontinua, pero en este caso, algunos sustratos se añaden escalonadamente a lo largo del proceso. También es un método robusto, bien conocido, que precisa de instalaciones simples, y, además, ofrece una mejora en la producción. Sin embargo, la utilización de los medios materiales y humanos sigue sin ser óptima.

Operación continúa: En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de cultivo con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema.

Se trata de un proceso continuo que permite una buena utilización de los recursos materiales y humanos. Sin embargo, requiere una atención mucho mayor que los modos de operación anteriores para lograr el mantenimiento de la estabilidad, por ejemplo, en la composición el sustrato, y de la esterilidad del sistema.

Biorreactores de enzimas o células inmovilizadas: Se trata de un sistema de producción continuo. Consiste en pasar el medio fresco a través de un biorreactor en el que hemos inmovilizado células (o enzimas). Con este sistema se eliminan los problemas de desequilibrio e inestabilidad de los sistemas abiertos y continuos.

## **Biorreactor**

Para Rodríguez (2003, p.56) un biorreactor o fermentador se define como “aquel dispositivo que proporciona un medio ambiente controlado que permite el crecimiento eficaz de las células y la formación de un producto”.

### **Requerimientos para el diseño del reactor**

Levenspiel (1971) menciona que los problemas implicados en el diseño de un reactor son la selección del mejor tipo de reactor para una reacción particular y la determinación de las mejores condiciones de operación. Doran por su parte afirma que el diseño del biorreactor es una tarea complicada, basada en principios científicos y de ingeniería y de muchas reglas empíricas. El conocimiento de la cinética de las reacciones es esencial para comprender como funcionan los reactores biológicos, aunque también son necesarias otras áreas de ingeniería de bioprocesos como los balances de materia y energía, la mezcla, transferencia de materia y la transmisión de calor (Doran, 1998, p.349).

Ruiz y colaboradores (2007, p.34) afirman que los biorreactores más utilizados a nivel industrial están provistos de mecanismos de agitación, dispersión y aireación, así como de sistemas para el control de la temperatura, pH. Los biorreactores deben ser optimizados para obtener la máxima concentración de productos de la fermentación, como lo son la biomasa microbiana y/o metabolitos en un tiempo mínimo y a menor costo de producción.

Los bioprocesos tienen como objetivo el crecimiento de células vivas. Para ello, es precisa la utilización de un entorno donde las condiciones de crecimiento

puedan ser controladas en todo momento. Los biorreactores son los recipientes o sistemas que ofrecen un ambiente biológicamente activo y controlado.

Para que el bioproceso tenga éxito, el diseño del biorreactor debe tener en cuenta tres aspectos principales: características de la célula, modo de operación y condiciones de esterilidad.

En la publicación de Ruiz y colaboradores, los criterios más importantes para el diseño de un biorreactor pueden resumirse del siguiente modo dependiendo del tipo de biorreactor y la fermentación a utilizar (Mitchell, 1992, p.98):

- a) El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante numerosos días, para evitar la aparición de contaminantes en las operaciones de bioprocesos de larga duración
- b) Debe permitir una mayor área de contacto entre las fases biótica y abiótica del sistema, es decir, se debe proporcionar un sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.
- c) El consumo de energía debe de ser el mínimo posible.
- d) Entradas para la adición de nutrientes y el control de pH.
- e) El crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, por lo que, el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor, del medio hacia las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular, además de mantener estable la temperatura deseada.
- f) Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
- g) Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.



h) El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente inoculado con el microorganismo deseado.

### 2.3. Marco conceptual

Existen modelos matemáticos que describen la cinética del crecimiento microbiano. La fermentación natural es una situación compleja con una abigarrada mezcla de alimentos y células que reaccionan incesantemente. Sólo se considerarán las situaciones más simples:

- Sólo actúa un tipo de microbio C, que en ocasiones se llamará célula o bicho.
- Sólo es necesario un tipo de alimento A, llamado sustrato.

Si el alimento es adecuado los bichos lo comen, se multiplican y en el proceso producen el material de desecho o residual, R.



Dónde:

*A : sustrato*

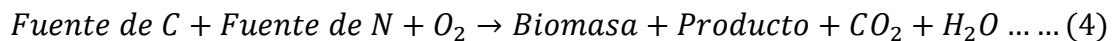
*R : producto*

*C : microbio*

En algunos casos, la presencia del producto R inhibe la acción de las células, sin importar cuánto alimento está todavía disponible, a este caso se le conoce como envenenamiento por el producto. (Levenspiel, 2004, p.623). El crecimiento celular obedece a las leyes de la conservación de la materia y de la energía, y

es posible describirlo mediante las reacciones químicas involucradas en la transformación de los nutrientes en biomasa y productos. En la célula ocurren simultáneamente cientos de reacciones químicas que constituyen parte de su metabolismo.

No obstante, en ocasiones es suficiente describir el crecimiento celular, el consumo de nutrientes y la producción de productos mediante un balance global de materia. Para el caso de organismos heterótrofos aerobios, tal balance se puede representar por medio de la siguiente ecuación (Ramírez, 2006, p.12):



Los balances anteriores aplican sólo para el estado estacionario, es decir, cuando todas las variables permanecen constantes con respecto al tiempo, incluyendo la composición de la biomasa. No obstante, en la mayoría de las condiciones prácticas se presentan situaciones cambiantes, por lo que es necesario estudiar el comportamiento cinético del cultivo. (Ramírez, 2006, p.16).

Los modelos cinéticos permiten no solamente predecir el comportamiento de un bioproceso, sino que son también una herramienta fundamental para idear sistemas y equipos, así como sus modos de operación y control respectivos. Además, el diseño de experimentos y la interpretación de los resultados pueden mejorarse mediante el uso de dichos modelos, lográndose con esto un entendimiento más profundo y riguroso de los procesos celulares y fisicoquímicos participantes (Ramírez, 2006, p.16).

Las características básicas de evolución de un proceso de fermentación son representadas en forma de una curva de crecimiento y medición. Dicho crecimiento es de suma importancia en los procesos de fermentación, ya que, manteniendo controlado dicho crecimiento, se mantiene controlada la producción del metabolito de interés. (Rodríguez Arévalo, 2003, p.56). En la Tabla 5, se muestra los modelos cinéticos para el crecimiento microbiano

**Tabla 5**

*Modelos para describir cinéticas de crecimiento*

<b>Algunos modelos comúnmente empleados para describir cinéticas de crecimiento</b>	
Ecuación logística	$X = \frac{x_0 \cdot e^{\mu t}}{1 - \frac{1}{x_m} \cdot x_0 \cdot (1 - e^{\mu t})}$
Cuando dos sustratos limitan simultáneamente	$\mu = \mu_m \left( \frac{S_1}{K_{S_1} + S_1} \right) \left( \frac{S_2}{K_{S_2} + S_2} \right)$
Modelo de Tessier	$\mu = \mu_m (1 + e^{-S/K_s})$
Modelo de Moser	$\mu = \mu_m (1 + K_s \cdot S^{-\lambda})^{-1}$
Modelo de Contois	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{BX + S}$
Modelo de Poell	$\mu = \mu_m \cdot \frac{K_s + L + S}{2L} \cdot \left[ 1 - \frac{\sqrt{1 - 4L \cdot S}}{(K_s + L + S)^2} \right]$

*Nota.* Dónde:  $x_m$  es concentración celular máxima,  $S_1$  y  $S_2$  son las concentraciones de los sustratos 1 y 2, respectivamente,  $K_{S_1}$  y  $K_{S_2}$  son las constantes de saturación para los sustratos 1 y 2, respectivamente,  $\lambda$  y  $B$  son parámetros empíricos, y  $L$  es un parámetro que depende de la resistencia difusional de sustrato alrededor de las células.

Fuente: Ramírez (2006)

Todo cultivo de microorganismo inoculado en un medio, pasa por diversas fases en un proceso de fermentación. Dichas fases son: la fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. (Rodríguez, 2003, p.56).

Este modo de cultivo consiste en agregar inicialmente un inóculo a un medio de cultivo fresco; después de una fase “lag” las células empezarán a crecer

exponencialmente consumiendo el sustrato disponible; al agotarse el sustrato (S) limitante, el crecimiento cesa, iniciándose la fase estacionaria; finalmente ocurre la fase de muerte al perderse las condiciones propicias que mantienen la viabilidad celular. (Ramírez, 2006, p.16),

Durante el crecimiento equilibrado, la velocidad específica de crecimiento está relacionada con la concentración del sustrato limitante del crecimiento mediante la ecuación de MONOD que es análoga a la de Michaelis Menten (Levenspiel, 2004, p.624). El modelo propuesto por Monod es, por su sencillez y generalidad, uno de los más ampliamente utilizados para describir adecuadamente la velocidad de crecimiento en un gran número de cultivos. El modelo de Monod establece una relación de tipo hiperbólico entre la tasa de crecimiento específica de los microorganismos y la concentración de sustrato limitante de acuerdo con la siguiente ecuación (Ramírez Arévalo, 2006: 19).

#### **2.4. Definición de términos básicos**

**Biorreactor:** El biorreactor es el tanque en el que los microorganismos llevan a cabo los procesos biológicos como la fermentación.

**Biotecnología:** Cuando se emplea células vivas para la obtención y mejora de productos útiles, como los alimentos y los medicamentos.

**Diseño:** El diseño es el plan que se sigue para configurar el objeto plasmado en figura.

**Fermentación:** Es el proceso de producción de moléculas de interés industrial a partir de microorganismos.

**Fermentador:** Es aquel tanque que contiene nutrientes, agua, microorganismos y otros, donde ocurre el proceso de fermentación.

**Fermentación ácido- láctica:** Es cuando el producto principal de la fermentación es el ácido láctico.

**Fermentación alcohólica:** Es cuando el producto principal de la fermentación es el alcohol etílico.

**Gránulos de kéfir:** Aglomeración simbiótica que se agrupan en el kefiran

**Kéfir:** Es la leche fermentada artificialmente y que contiene ácido láctico, alcohol y ácido carbónico.

**Kefiran:** Llamado también kefirano, es una matriz polisacárida

**Knock how:** Forma de hacer algo basado en la experiencia más no en un conocimiento científico.

**Probióticos:** Son los microorganismos vivos que forman parte de un alimento y ejercen importantes efectos fisiológicos, contribuyendo al equilibrio de la flora bacteriana intestinal y potenciando al sistema inmune. Forman parte de ciertos alimentos fermentados.

**Simbiosis:** Es la asociación estrecha de dos o más organismos de diferentes especies, que se benefician el uno al otro y viceversa.

**Tecnología:** La tecnología viene a ser el conjunto de los instrumentos y procedimientos industriales de un producto específico.

**Velocidad microbiana:** Es un incremento en el número de células o aumento de la masa microbiana.

### **III. HIPÓTESIS Y VARIABLES**

#### **3.1. Hipótesis**

##### **3.1.1. Hipótesis General**

Un modelo adecuado que cumpla con las condiciones establecidas permitirá el diseño de un biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche.

##### **3.1.2. Hipótesis específicas**

- a) Seleccionando una adecuada tecnología nos permitirá la producción de kéfir de leche.
- b) El uso de un modelo matemático adecuado de la cinética de reacción microbiana nos permitirá desarrollar una tecnología para la producción de kéfir de leche.
- c) El análisis de los fundamentos y procedimientos de diseño nos permitirá diseñar el biorreactor para la producción de kéfir de leche.

### 3.2. Definición conceptual de variables.

Las variables identificadas son las que se muestra en la figura 3:

**Figura 3**

*Definición de variables*

Y=Diseño de un biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche.

$$y = f(x_1, x_2, x_3,)$$

$X_1$ = Tecnología para la producción de kéfir de leche.

$X_2$ = Modelo matemático de la cinética de reacción microbiana para la producción de kéfir de leche.

$X_3$ = Fundamentos y procedimientos de diseño.



### 3.2.1. Operacionalización de variables (dimensiones, indicadores y métodos)

Tabla 6

*Operacionalización de variables*

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
<b>DEPENDIENTE</b>	Volumen	m <sup>3</sup>	Relacionando las variables independientes mediante un modelo adecuado que cumpla con las condiciones establecidas se desarrollará el procedimiento de diseño del fermentador
y= Diseño de un biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche.	Altura,	m	
	Diámetro	m	
<b>INDEPENDIENTE</b>			
X <sub>1</sub> = Tecnología para la producción de kéfir de leche.	Temperatura	°C	De las tecnologías publicadas en la literatura especializada se seleccionará la más adecuada para nuestro propósito
	Acidez	pH	
	Tiempo de fermentación	h	
	Concentración	%	
X <sub>2</sub> = Modelo matemático de la cinética de la reacción microbiana para la producción de kéfir.	Rendimiento del producto	%	Del análisis de los modelos matemáticos para la cinética se escogerá el más adecuado
X <sub>3</sub> = Fundamento y procedimiento de diseño.	Cantidad de alimentación	m <sup>3</sup>	El desarrollo de la ingeniería de detalles permitirá diseñar detalladamente el fermentador.
	Velocidad de agitación	rpm	

## **IV. DISEÑO METODOLÓGICO**

Para lograr los objetivos propuestos de esta investigación se ha relacionado el Diseño del reactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche con las tecnologías existentes para la producción de kéfir de leche y los fundamentos y procedimientos de diseño de biorreactores.

### **4.1. Tipo y diseño de la investigación**

El presente trabajo de investigación por su finalidad es de tipo aplicado dado que sus resultados tienen una aplicación práctica y por su diseño interpretativo es de tipo experimental. De acuerdo a la naturaleza de los datos manejados, las variables de investigación son cuantitativas, y se encuentra ubicado dentro del área de Ingeniería y Tecnología, la subárea es Biotecnología Industrial.

#### **4.1.1 Diseño de la investigación**

El diseño de la presente investigación ha considerado 3 etapas.

##### **Primera etapa de la investigación**

En esta primera etapa, con base a la información de la teoría vinculada a las variables de investigación se obtendrá la mejor tecnología para la producción de kéfir, así como el modelo matemático adecuado de la cinética de reacción microbiana para la producción de kéfir y los fundamentos y procedimientos del diseño de biorreactores.

## **Segunda etapa de la investigación**

Con la información obtenida en la etapa anterior, se procedió a realizar un análisis de la información obtenida y el tratamiento de los resultados referidos al diseño del biorreactor para la producción de kéfir de leche.

## **Tercera etapa de la investigación**

En esta tercera etapa de la investigación con la teoría y la información obtenida se procedió al diseño del biorreactor, esto es su capacidad, dimensiones y el sistema de agitación.

Para el diseño del biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche se tomó en consideración un volumen de producción de  $0.1 \text{ m}^3$ , entendiendo que el diseño a nivel banco establece una producción mayor que la obtenida a nivel laboratorio, pero menor que nivel planta piloto.

### **4.2. Método de investigación**

El método de la presente investigación obedece a un modelo experimental-longitudinal, observacional, deductivo, método de modelación.

### **4.3. Población y muestra**

Para la presente investigación no aplica el concepto de población y muestra.

#### **4.4. Lugar de estudio y período desarrollado**

El presente trabajo de investigación se realizó en la facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao, durante los meses de enero a junio del año 2021.

#### **4.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de la información**

Para contrastar y demostrar las hipótesis de trabajo se aplicaron técnicas de investigación descriptiva y métricas.

Se aplicó una técnica descriptiva para la recolección y acondicionamiento de la materia prima. Y se aplicó una técnica métrica para evaluar el rendimiento de acuerdo con la cinética elegida.

Ante la imposibilidad material de obtener información para todos los indicadores de las variables contempladas, para poder alcanzar todos los propósitos de este estudio, se ha recurrido a informaciones de fuentes secundarias.

##### **4.5.1. Procedimiento experimental**

#### **A) Selección de la tecnología para producir kéfir**

Para la producción de kéfir de leche hay tres formas principales:

- **Método Artesanal**

Generalmente, el kéfir se puede hacer a partir de cualquier tipo de leche, de vaca, de cabra, de oveja, de coco, de arroz o de soja. También hay muchas opciones para la leche, pasteurizada, no pasteurizada, con toda su grasa natural (nata), baja en grasa o desnatada (Otlés y Cagindi, 2003).

Incluso se podría hacer kéfir a partir de zumos de frutas y/o soluciones azucaradas o de melazas (Magalhães et al., 2010).

La producción artesanal tradicional involucra inoculación directa de la leche con una cantidad variable de gránulos. Primero la leche cruda se hierbe, luego se enfría a unos 20-25 °C y se inocula con un 2-10% (generalmente un 5%) de gránulos de kéfir. Tras esto, empieza un periodo de fermentación de entre 18- 24 horas a 20-25°C. Al terminar el proceso de fermentación, los gránulos se tamizan y este filtrado se puede volver a usar para una nueva fermentación o guardar en leche fresca (de 1 a 7 días), mientras que la bebida de kéfir se debe almacenar a 4°C, lista para su consumo (Karagozlu y Kavas, 2000).

- Proceso comercial mediante el método ruso

Permite la producción de kéfir a gran escala. Esta emplea un proceso de fermentación en series, partiendo del filtrado obtenido en la primera fermentación de los gránulos, los cuales son fermentados sin los gránulos o sin el cultivo madre (Farnworth y Mainville, 2008; Rattray y O'Connel, 2011).

El primer paso es la homogeneización de la leche a un 8% de materia seca mediante un tratamiento de calor a 90-95°C durante 5- 10 minutos. Luego, la leche se enfría a 18-24°C y se inocula con un 2-8% de cultivos puros aislados de gránulos de kéfir y cultivos comerciales iniciadores en tanques de fermentación. El tiempo de fermentación puede variar de 18 a 27 horas. Tras esto, el coágulo se separa con ayuda de una bomba y se distribuye, generalmente, en botellas (Otlés y Cagindi, 2003).

Luego le sigue una fase de maduración, la cual puede darse o no, esta fase consiste en conservar el kéfir a 8-10°C durante al menos 24 horas, para permitir el

crecimiento de microorganismos, principalmente levaduras, contribuyendo al sabor específico del producto. La omisión de este paso se asocia con el desarrollo de un sabor atípico en el kéfir (Beshkova et al., 2002; Rattray y O'Connel, 2011). También cabe destacar que, durante la etapa de almacenamiento, la producción de CO<sub>2</sub> por parte de las levaduras o las LAB heterofermentativas puede causar el aumento de volumen del producto, este hecho debe ser considerado a la hora de elegir el embalaje del producto (Farnworth y Mainville, 2008; Sarkar, 2008). Tras la maduración, el producto se almacena en cámaras frigoríficas a 4°C.

- Proceso comercial mediante cultivos puros

El desarrollo de un “tipo o variedad de kéfir” no es la única aplicación industrial que ha sido investigada. Los gránulos de kéfir también han sido estudiados en cuanto a la producción de SCP (single cell protein), una proteína que interviene en la biotransformación del suero de queso y su aplicación en la industria alimentaria, para mejorar las características sensoriales de algunos productos. (Paraskevopoulou et al. 2003). Las principales deficiencias en la fabricación de kéfir se pueden atribuir al sabor desagradable y aroma típico a levadura. Este último puede ser causado por el crecimiento rápido de *S. cerevisiae*, acompañado de un aroma a vinagre (Tamime, 2006). La producción excesiva de ácido acético también puede influir en el aroma del kéfir, y éste ocurre debido al crecimiento intenso de *Acetobacter* spp. o la presencia de *Dekkera* spp. en los granos de kéfir. También puede darse un sabor amargo causado por hongos (por ejemplo, *Geotrichum candidum*) y/o la actividad de algunas levaduras atípicas que pueden estar presentes en el producto (Tamime, 2006).

## B) Selección del modelo cinético de la reacción microbiana

Para la selección del modelo más adecuado para describir la cinética de la reacción microbiana, como los mostrados en la Tabla 5, nos basamos en las recomendaciones obtenidas en la bibliografía la cual reporta que el modelo de Baranyi-Roberts es el más apropiado para describir esta cinética, cuyos parámetros cinéticos fueron tomados de Malma (2021).

### Modelo de BARANYI-ROBERTS

Es uno de los modelos extendido para el modelado del crecimiento microbiano en la actualidad. Este modelo describe el crecimiento como una cinética de primer orden que varía en función de sus condiciones ambientales y según la fase que se encuentre la población. Cuando se encuentra en la fase exponencial este coeficiente es igual a  $\mu_{\text{máx}}$ , mientras que durante las fases de adaptación y estacionaria se reduce por medio de los coeficientes  $\alpha(t)$  y  $\gamma(t)$ , ambos comprendidos entre cero y uno.

$$Y(t) = y_{\text{máx}} + \ln \left[ \frac{-1 + e^{\mu_{\text{máx}} * \lambda} + e^{\mu_{\text{máx}} * t}}{-1 + e^{\mu_{\text{máx}} * t} + e^{(\mu_{\text{máx}} * \lambda + y_{\text{máx}} - y_0)}} \right] \dots \dots \dots (9)$$

Dónde:

$y(t)$ :  $\ln N(t)$ , siendo  $N(t)$  la densidad bacteriana ( $\text{UFC g}^{-1}$ ) en el tiempo  $t$

$y_0$ :  $\ln N_0$ , siendo  $N_0$  la densidad bacteriana ( $\text{UFC g}^{-1}$ ) en el tiempo 0

$y_{\text{máx}}$ :  $\ln N_{\text{máx}}$ , siendo  $N_{\text{máx}}$  la máxima densidad bacteriana ( $\text{UFC g}^{-1}$ )

$\mu_{\text{máx}}$ : Máxima velocidad específica de crecimiento ( $\text{tiempo}^{-1}$ )

$\lambda$ : Tiempo de latencia (t)

## Cálculo de la velocidad de reacción empleando el Modelo Baranyi-Roberts

La velocidad de crecimiento se determinó aplicando el modelo de Baranyi- Roberts al crecimiento bacteriano con diferentes temperaturas (4 °C, 20 °C, 30°C), en la tabla se observa los parámetros obtenidos con el programa Combase. La Tabla 6 se muestra los parámetros de modelamiento, la velocidad de crecimiento según la temperatura de operación.

**Tabla 6**

### *Parámetros de modelamiento*

Parámetros	Valor		
	T= 4 °C	T= 20 °C	T= 30 °C
Tiempo de latencia	14,927 ± 0,932	13,826 ± 1,664	12,235 ± 1,712
Velocidad máxima de crecimiento	0,646 ± 0,070	0,919 ± 0,167	0.92 ± 0.159
Logaritmo inicial de la densidad de células bacterianas	9,84 ± 0,070	10,348 ± 0,562	11,285 ± 0,607
Logaritmo final de la densidad de células bacterianas	19,203 ± 0,198	22,671 ± 0,563	24,424 ± 0,606

Fuente: (Malma, 2021)



## **C) Fundamentos y procedimientos de diseño de biorreactores**

Por el volumen de producción, se ha escogido un biorreactor Batch.

### **Diseño de un Biorreactor Batch**

Los biorreactores sin agitación y sin aireación son utilizados para microorganismos anaerobios, o aerobios facultativos, principalmente en procesos de fermentación, son generalmente de construcción más simples (Doran, 352).

El diseño experimental prescribe una serie de pautas relativas qué variables hay que manipular, de qué manera, cuántas veces hay que repetir el experimento y en qué orden para poder establecer con un grado de confianza predefinido la necesidad de una presunta relación de causa-efecto (Román, 2000).

Así se va especificar la concentración del sustrato alimentada y la velocidad de flujo de entrada.

### **Bases de diseño**

Las condiciones de diseño son las siguientes:

- Cantidad o escala de producción.
- Tipo de proceso: Batch

Las condiciones de operación serán a temperatura constante y agitación continúa.

### **Calculo de capacidad**

La capacidad o volumen del biorreactor, se fijó por el volumen de producción, para el tipo de biorreactor seleccionado.

## Diseño de detalles o dimensionamiento

Diseño de biorreactores discontinuos

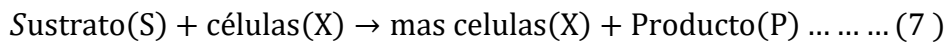
$$\frac{-dS}{dt} = \left( \frac{r_{m\acute{a}x} * S}{K_M + S} \right) \dots \dots \dots (5)$$

### *Integrando*

$$t_{rxn} = \frac{K_M}{r_{max}} * \ln \frac{S_0}{S} + \frac{S_0}{r_{max}} - S \dots (6)$$

## Cinética de crecimiento

La ecuación de Monod es una de las ecuaciones más utilizadas, describe el crecimiento celular en función del sustrato limitante.



$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu_m \times \frac{S \times N}{K_s + S} \dots \dots \dots (8)$$

Donde:

$r_x$ : velocidad de crecimiento de las células

$\mu_x$ : velocidad especifica maxima de crecimiento

K: constante de Monod

## Rendimiento Biomasa sustrato:

El rendimiento del proceso relaciona la producción de biomasa con el consumo de sustrato.

$$Y_{c/s} = \frac{\text{masa de células nuevas formadas}}{\text{masa de sustrato consumida para producir células nueva}} \dots\dots(10)$$

$$Y_{p/s} = \frac{\text{masa de producto formado}}{\text{masa de sustrato consumido para formar producto}} \dots(11)$$

## Dimensionamiento del biorreactor

Para el dimensionamiento se calcula la relación de altura-diámetro (H-D) de 2:1 mediante la ecuación:

$$V_F = \frac{\pi * D^2 * H}{4}$$

Las siguientes ecuaciones matemáticas se aplican para el dimensionamiento del biorreactor tipo batch.

### Volumen del biorreactor (Erazo y Lata, 2012, p. 41)

Para el volumen se tomó en cuenta la cantidad de materia prima para la elaboración del kéfir de leche esto es, 0.1 m<sup>3</sup>.

$$V_R = V * 1.15$$

Dónde:

V=Volumen de leche a procesar 0.1 m<sup>3</sup>

V<sub>R</sub>=Volumen final del biorreactor considerando el factor de seguridad (m<sup>3</sup>)

Factor de seguridad: 15% del volumen de leche a procesar.

$$V_R = 0.1 * 1.15$$

$$V_R = 0.115m^3$$

Para el dimensionamiento se calcula la relación de altura-diámetro (H-D) de 2:1

mediante la ecuación:

$$V_R = \frac{\pi * Di^2 * H}{4}$$

$$V_R = \frac{\pi * Di^2 * 2Di}{4}$$

$$V_R = \frac{\pi * Di^3}{2}$$

$$Di = \sqrt[3]{\frac{2 * V_R}{\pi}}$$

$$Di = \sqrt[3]{\frac{2 * 0.115}{3.1416}}$$

$$Di = 0.42m$$

$$H = 2Di$$

$$H = 2 * 0.42$$

$$H = 0.84m$$

**Radio del biorreactor (Erazo y Lata, 2012, p.41)**

$$r_R = \frac{Di}{2}$$

$$r_R = \frac{0.42}{2}$$

$$r_R = 0.21m$$

Dónde:

$r_R$ =Radio del biorreactor(m)

$Di$ =Diámetro interno del reactor (m)

**Altura del líquido ( $h_L$ ) (Erazo y Lata, 2012, p. 41)**

La cantidad de leche destinada para la elaboración de yogurt son  $0.1m^3$ . Con este volumen determinamos la altura del líquido. Despejamos de la fórmula:

$$V_l = h_L * A$$

$$A = \pi * r^2$$

$$h_L = \frac{V_l}{\pi * r^2}$$

$$h_L = \frac{0.1m^3}{\pi * (0.21m)^2}$$

$$h_L = 0.72m$$

## **Calculo de sistema de agitación**

### **Impulsores (agitadores)**

Los agitadores de impulsor o rodete se dividen en dos clases. Los que generan corrientes paralelas al eje del impulsor se llaman impulsores de flujo axial; y aquellos que generan corrientes en dirección radial o tangencial se llaman impulsores de flujo radial. Los tres principales tipos de impulsores para líquidos de baja a moderada viscosidad son las hélices, turbinas e impulsores de alta eficiencia (McCabe, 261).

### **Agitador de palas o de paletas**

Operan a velocidades moderadas, es un agitador de flujo radial y axial. (McCabe, 1993). Se usan de 2 a 4 paletas que giran en eje vertical; ubicadas en el centro del tanque. Los agitadores de paletas giran a una velocidad comprendida entre 20 y 200 rpm. La longitud total del propulsor es del orden de 50 al 80% del diámetro interno del tanque. La anchura del agitador es de 1/6 a 1/10 de su longitud. (Geankopolis, 1998).

### **Ecuaciones de diseño para el agitador**

Para el diseño del agitador usaremos ciertos parámetros: Número de Reynolds, diámetro del rodete, potencia del motor, altura del fluido en el tanque, longitud del brazo del agitador, distancia entre el fondo del tanque y la paleta de agitación.

### **Hélices (propulsor).**

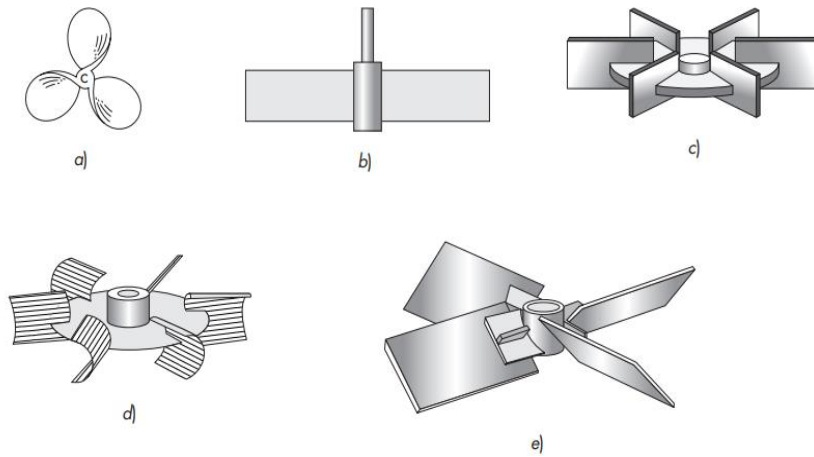
Una hélice es un impulsor de flujo axial y alta velocidad que se utiliza para líquidos de baja viscosidad. Las hélices pequeñas giran con la misma velocidad que el motor, ya sea a 1 150 o 1 750 rpm; las grandes giran de 400 a 800 rpm. La dirección de la rotación se elige generalmente para impulsar el líquido a descender, y las corrientes de flujo que salen del impulsor continúan a través del líquido en una dirección determinada hasta que chocan con el fondo del tanque.

### **Turbinas.**

En la figura se representan cuatro tipos de agitadores de turbina. En la figura se muestra la turbina sencilla de palas rectas, que empuja al líquido en forma radial y tangencial, casi sin movimiento vertical al agitador. Las corrientes que genera se desplazan hacia fuera hasta la pared del tanque y entonces fluyen hacia arriba o hacia abajo. Tales agitadores son llamados a veces paletas. En los tanques de proceso, los agitadores industriales típicos de paletas giran a velocidades comprendidas entre 20 y 150 rpm. (McCabe, 261). De la figura 4, veremos los tipos de agitadores.

**Figura 4**

*Agitadores para Líquido de Viscosidad Moderada de tres Pala*



Fuente: McCabe (1993)

**Longitud del brazo agitador (Coker, 2001, p. 895):**

$$Lb = \frac{5}{8} * Di$$

Dónde:

Lb: Longitud del brazo del agitador (m).

Di: Diámetro interno del reactor (m).

$$Lb = \frac{5}{8} * 0.42$$

$$Lb = 0.26 \text{ m}$$



**Diámetro del eje (Coker, 2001, p. 895):**

$$E_R = \frac{1}{10} * L_b$$

$$E_R = \frac{1}{10} * L_b$$

$$E_R = \frac{1}{10} * 0.26$$

$$E_R = 0.026 \text{ m}$$

Dónde:

$E_R$ : Espesor del rodete (m).

$L_b$ : Longitud del brazo del agitador (m).

**Diámetro del rodete (Coker, 2001, p. 895):**

$$d_R = \frac{3}{4} * D_i$$

$$d_R = \frac{3}{4} * 0.42$$

$$d_R = 0.315 \text{ m}$$

Dónde:

$d_R$ : Diámetro del rodete (m).

$d_i$ : Diámetro interno del reactor (m).

**Distancia entre el fondo del tanque y del rodete (Coker, 2001, p. 895)**

$$E = h - L_b$$

Dónde: X = Distancia entre el fondo del tanque y el rodete (m).

$h_L$  = Altura del líquido (m).

$$E = (h_L - L_b) m$$

$$E = (0.72 - 0.26)m$$

$$E = 0.46 m$$

**Alto de la paleta (Coker, 2001, p. 895)**

$$A_p = \frac{1}{10} * L_b$$

$$A_p = \frac{1}{10} * (0.26m)$$

$$A_p = 0.026 m$$

Dónde:

$L_b$ : Longitud del brazo del agitador (m).

$A_p$ : Altura de la paleta (m).

**Distancia entre paletas (Coker, 2001, p. 895)**

$$X_p = \frac{\frac{1}{2} * L_B}{n}$$

$$X_p = \frac{\frac{1}{2} * 0.26 \text{ m}}{3}$$

$$X_p = 0.043 \text{ m}$$

Dónde:

$X_p$ : Distancia entre paletas (m).

$L_b$ : Longitud del brazo del agitador (m).

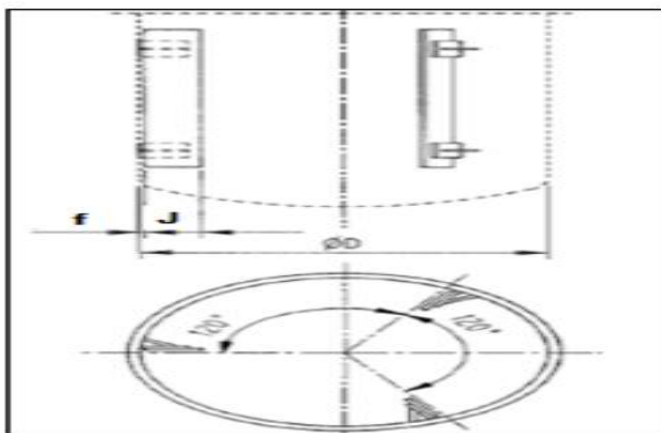
n: Número de palas inclinadas del agitador.

### Placas deflectoras.

Son pletinas planas verticales se ubican radialmente a interior del estanque de la Figura 5, se muestra las placas deflectoras distribuidas en estanque. El ancho habitual para agitadores de turbina no deba ser mayor que 1/12 del diámetro del estanque. Para agitadores de hélice basta con 1/8 de diámetro (Ver Tabla 7).

### Figura 5

*Placas deflectoras distribuidas en estanque*



Fuente: McCabe (2007)

**Tabla 7***Dimensiones de placas deflectoras (en mm)*

Diámetro	J	f
100	8	2
200	16	4
300	24	6
400	32	8
500	40	10
600	48	12
800	64	16
1000	100	20
1200	110	24
1600	128	32
2000	160	40
2500	200	50
3000	240	60
4000	320	80
4500	360	90
5000	400	100
6000	480	120
7500	600	150
10000	800	200
12000	960	240

Fuente: McCabe (2007)

**Cálculo del número del Reynolds** (McCabe, Smith y Harriot, 1998, p. 258)

$$N_{RE} = \frac{Dr^2 * N * \delta}{\mu}$$

Dónde:

$N_{RE}$ : Número de Reynolds (adimensional).

$Dr^2$ : Diámetro del rodete (m)<sup>2</sup>

N: Número rotacional (rps).

$\delta$ : Densidad del fluido (Kg/m<sup>3</sup>)

$\mu$ : Viscosidad del fluido (Kg/m\*s) 436.8cp

La velocidad rotacional de un agitador tipo paletas está comprendido entre 20 y 200 rpm, se utilizará una velocidad de 90 rpm.

$$N_{RE} = \frac{(0.90m)^2 * 1.5 rps * 1038 \text{ Kg/m}^3}{436.8cp}$$

$$N_{RE} = 2.887$$

Calculando el Número de Reynolds determinamos al tipo de flujo que corresponde: Si el  $N_{RE} < 10$  corresponde a un flujo laminar.  $10 < N_{RE} < 10000$  el flujo es turbulento en el agitador y laminar en las partes más lejanas.  $N_{RE} > 10000$  es flujo turbulento. (Rockwell International Corporation, 2000; Benavides, 2014, p.109).

#### **4.6. Análisis y procesamiento de datos**

En esta etapa se analizó las diferentes tecnologías para la producción del kéfir de leche, así como los diferentes modelos matemáticos que describen la cinética de las biorreacciones.

En función del volumen de producción y los fundamentos de diseño se logró diseñar el biorreactor a nivel banco para la producción del kéfir de leche.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Resultados descriptivos

Como generalmente, el kéfir se puede hacer a partir de cualquier tipo de leche, de vaca, de cabra, de oveja, de coco, de arroz o de soja. También hay muchas opciones para la leche, pasteurizada, no pasteurizada, con toda su grasa natural (nata), baja en grasa o desnatada (Otlés y Cagindi, 2003).

Respecto del problema específico 1:

La tecnología que más se acomodaba a nuestra investigación fue el método artesanal debido a que nuestro objetivo era el diseño del biorreactor sin entrar en detalles de los accesorios de la planta como podrían ser bombas, centrifugas, filtros, etc.

Respecto del problema específico 2:

De la Tabla 5 que muestra los diferentes modelos matemáticos para describir la cinética de biorreacciones, se escogió el modelo de Baranyi-Roberts, con base a la experiencia reportada en la literatura especializada (Garre, 2016).

Respecto del problema general:

Los fundamentos y procedimientos del diseño nos permitieron diseñar detalladamente el biorreactor. Se realizó el diseño, considerando un biorreactor tipo Batch, debido a que el volumen de producción es pequeño (100 L).

Los cálculos obtenidos se muestran en la Tabla 9, los resultados del diseño del biorreactor.

**Tabla 8***Resultado del diseño del biorreactor*

<b>Elementos</b>	<b>Valores</b>	<b>Unidades</b>
$V_R$ Volumen del biorreactor	0.115	$m^3$
$Di$ Diámetro interno	0.42	$m$
$H$ Altura	0.84	$m$
$r_R$ Radio del biorreactor	0.21	$m$
$h_L$ Altura del líquido	0.72	$m$
$Lb$ Longitud del brazo agitador	0.26	$m$
$E_R$ Diámetro del eje	0.026	$m$
$d_R$ Diámetro del rodete	0.315	$m$
$E$ Distancia entre el fondo del tanque y del rodete	0.46	$m$
$A_p$ Alto de la paleta	0.026	$m$
$X_p$ Distancia entre paletas	0.043	$m$
$N_{RE}$ Número del Reynolds	2.887	
$V_a$ Velocidad de agitación	90	$rpm$



## **5.2. Resultados inferenciales (estadística inferencial) población muestra**

En esta tesis mostrada no aplica.

## **5.3 Otro tipo de resultados**

En la tesis mostrada no aplica otros resultados.

## **VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **6.1 Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados.**

#### **Hipótesis específicas**

**a)** La tecnología adecuada seleccionada se realizó teniendo en cuenta el volumen de producción, siendo la tecnología del método artesanal la elegida.

**b)** Con base a la experiencia reportada en la literatura especializada, de entre los modelos matemáticos para describir la cinética de biorreacciones se eligió el modelo matemático de Baranyi- Roberts como el más adecuado para la cinética de reacción microbiana para la producción de kéfir de leche.

**c)** Con base a los fundamentos y procedimientos de diseño se logró diseñar el biorreactor para la producción de kéfir de leche.

#### **Hipótesis general**

Un modelo adecuado como el modelo matemático de Baranyi-Roberts permitió el diseño del biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche.

### **6.2 Contrastación de los resultados con otros estudios similares.**

Cejudo y Bautista (2019) en su trabajo de investigación, realizaron la producción de kéfir de leche en un biorreactor empleando agitación manual; en nuestro trabajo de tesis, se ha diseñado el sistema de agitación mecánico.

Rodrigo, Cabrera y Valencia (2003) en su investigación se enfocaron en la instrumentación de un biorreactor prototipo; en nuestra investigación nos hemos centrado en el dimensionamiento del biorreactor y su sistema de agitación.

Arévalo y Arias (2014) en su investigación se centraron en el estudio de la velocidad de agitación en el biorreactor; en nuestra investigación no se hizo dicho estudio.

### **6.3 Responsabilidad ética de acuerdo a los reglamentos vigentes**

La elaboración de la tesis se ciñó estrictamente al Reglamento del Código de Ética de la Investigación de la Universidad Nacional del Callao, Resolución de Consejo Universitario N° 260-2019-CU.

## CONCLUSIONES

### 1. Respecto del primer problema específico

Con base a la experiencia y a nuestro volumen de producción (nivel banco), la tecnología elegida fue el método artesanal.

### 2. Respecto del segundo problema específico

El modelo matemático que mejor describe la cinética de biorreacciones, es el modelo de Baranyi-Roberts.

### 3. Respecto del problema general:

Con base a los fundamentos y procedimientos del diseño y los resultados de los problemas específicos se logró diseñar detalladamente el biorreactor y su sistema de agitación, eligiendo un biorreactor tipo Batch.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer un estudio minucioso de la cinética de la biorreacción a fin de utilizar medios estadísticos para la elección más adecuada del modelo matemático.
- Se recomienda realizar un estudio de la influencia de la velocidad de agitación con respecto a la calidad del producto.
- Mediante técnicas de escalamiento se recomienda extrapolar los resultados a escala piloto y llevar el proceso a un sistema continuo.
- Realizar la construcción del biorreactor tipo banco para efectos de instrucción para los estudiantes de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alais, C. (2003). *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. Sevilla: Editorial Reverté.
- Arévalo, F. y Arias, G. (2007). *Estudio Comparativo del efecto de las temperaturas constante y variable ambiente en la producción de biomasa proveniente de la microbiota del grano de kéfir*. Ciencia e Investigación.
- Arévalo, O. y Quispe, C. (2008). *Control y regulación del pH en una fermentación láctica utilizando carbonato de calcio como regulador y microbiota de granos de Kéfir como agente biológico*. Ciencia y Desarrollo, 9(01), 5-10.
- Arévalo, F. y Arias, G. (2014). *Estudio de la velocidad de agitación en la producción de biomasa de granos de kéfir*. Ciencia E Investigación, 17(1), 16-20.
- Atkinson, B. (1985). *Reactores Bioquímicos*. Editorial Reverté.
- Bai, Xiaojia (2009). Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol* 84, 341–347.
- Beshkova, D., Simova, D., Simov, I., Frengova, I. y Spasov N. (2002) *Pure cultures for making kefir*. Food Microbiol
- Cejudo, V. y Bautista, G. (2019). *Producción de leche bulgarada en un biorreactor aerobio utilizando un cultivo inmovil de kéfir*. Revista Tecnológica Agroalimentaria.
- Chavez, O. (2018). *Diseño de un reactor tipo batch para la elaboración de yogur*. Ecuador.
- Coker, K. (2001). *Ludwig's Applied Process Design for Chemical and Petrochemical Plants*. USA: Elsevier.

- Crueger, W., Crueger, A. y Liras, P. (1993). *Biotecnología - Manual de Microbiología Industrial*. Acribia.
- Doran, P. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Zaragoza: Acribia.
- Erazo, S. y Lata, M. (2012) *Diseño y Construcción de una marmita automatizada para la elaboración de queso*. Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Farworth, E. y Mainville, I. (2008) *Kefir – A Fermented Milk Product*. In: *Farnworth, E. R. (2ª Ed)*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York
- Gálvez, M. y Heras S. (2012). *Estudio experimental sobre la obtención de kéfir (leche kefirada) en nuestro medio, partiendo de la reproducción y mantención de los nódulos de kéfir*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química.
- Garre, P., Egea, L., Fernández, S. (2016). *Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos*. Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA). Anuario de Jóvenes Investigadores, vol. 9
- Garrote, L., Abraham, G. y De Antoni, L. (1998). Preservation of kefir grains, a comparative study. *LWT-food science and technology*
- Geankoplis, C. (2006). *Procesos de Transporte y principios de procesos de separación*. México: Compañía Editorial Continental.
- Geankoplis, C. (1998). *Procesos de Transporte y Operaciones unitarias*. México: Compañía Editorial Continental.
- Guerra, Y., Hernández, A., Pedroso, Y. y Pérez H. (2014). *Desarrollo de un helado de leche con cultivos probióticos*. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba.

- Karagozlu, C. y Kavas G. (2000) *Alkollü fermente süt içecekleri: Kefir ve kimizin özellikleri ve insan beslenmesindeki önemi*. Gıda
- Lázaro, A. (2013). *Diseño de biorreactores y fermentadores*. Tecnología de los bioprocesos, 1-6.
- Leite, A., Lemos, M., Silva, R., Soares, A., Trajano, J. y Flosi V. (2013) *Microbial, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage*. Brazilian Journal of Microbiology
- Levenspiel, O. y Conesa, J. (2005). *Ingeniería de las reacciones químicas*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Lopitz, O., Rementeria, A., Elguezabal, N. y Garaizar, J. (2006). *Kefir: a symbiotic yeasts - bacteria community with alleged healthy capabilities*. Revista Iberoamericana de Micología, 67-74.
- Machaca, G. (2009). *Análisis y diseño del reactor para la obtención del 2,6 diclorofenol - indofenol a nivel banco*. Callao: Universidad nacional del Callao.
- Magalhães, T., Pereira, M., Dias, R., Shwan, F. (2010) *Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir*. World J Microbiol Biotechnol 26:1241-1250.
- Malma, R. (2021). *Proceso homofermentativo de kéfir con bacterias probióticas típicas para prolongar su tiempo de vida útil*. Perú.
- McCabe, S. y Harriott, W. (2007). *Operaciones Unitarias en ingeniería química*. México: McGraw-Hill, Interamericana.
- Montoya, V. (2008). *Microbiología básica para el área de salud y afines*. Antioquía, Colombia: Universidad de Antioquía.



- Neyra, r. (2012). *Fermentaciones industriales*. Lima.
- Otles, S. y Cagindi, O. (2003) *Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects*. Pakistan J Nutr 2: 54-59.
- Paginas arabes. (2017). *Obtenido de <https://paginasarabes.com/2017/11/07/el-kefir-los-granos-del-profeta-muhammad/>*
- Paraskevopoulou, A., Athanasiadis, I., Kanellaki, M., Bekatorou, A., Blekas G., Kiosseoglou, V. (2003). *Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora*. Food Res Int.
- Ramirez, H. (2020). *Actividad Metabólica,viabilidad y expolisacaridos de bacterias lácticas de granos de kéfir liofilizado con potencial tecnológico en la región central*. Universidad Nacional del centro del Perú, Huancayo.
- Rattray, P. y O'Connell J. (2011) *Fermented Milks Kefir*. In: Fukay, J. W. (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences (2°Ed). Academic Press, San Diego, USA.
- Rodriguez, A., Cabrera, L. y Valencia, F. (2003). *Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo*. Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica, 24(1), 55-70.
- Ruiz, A. Villavicencio, Y., Ochoa, P., y Mendoza, M. (2017). *Beneficios del kéfir para la salud*. Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento, 296-311.
- Ruiz, L., Rodriguez, J., Rodriguez, H., Contreras, E. y Aguilar, J. (2007). *Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 6(1), 33-40.
- Salas, S.y Valadez, M. (2014). *Caracterización e identificación molecular de bacterias aisladas de kéfir*. Agroproductividad, 7(3).

- Sarkar, S. (2008) *Biotechnological innovations in kefir production: a review*. Br. Food J 1
- Stanley, M. (1990). *Chemical Process Equipment*. Washington: British Library.
- Tamime, Y. (2006) *Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products*. In: Tamime, A. Y. (ed.), *Fermented Milk* Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, p.174-216
- Tavares, B., Valente, P., Corcao , G., Peres , A., y Keller, M. (2018). *Characterization Physico-Chemical and Microbiological of Fermented milk by Kefir*. *Revista Científica Virvi Ramos*, 56-64.
- Tuğba, K., Atif, C., Barbaros, O., y Zeynep, B. (2013). *Efectos diferentes parámetros de fermentación sobre las características de calidad de kéfir*. Turquía: Universidad Suleyman Demirel.
- Vega, H. (2020). *Diseño conceptual de un biorreactor para la producción de biomasa de Azotobacter Chroococcum a escala banco*. Bogotá.

**ANEXO N°1**

**MATRIZ DE CONSISTENCIA**

**DISEÑO DEL BIORREACTOR A NIVEL BANCO PARA LA PRODUCCIÓN DE KÉFIR DE LECHE**

<b>PROBLEMA GENERAL</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>HIPÓTESIS GENERAL</b>	<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADORES</b>
¿Cómo se va diseñar el biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche?	Diseñar un biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche.	Un modelo adecuado que cumpla con las condiciones establecidas permitirá el diseño de un biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche.	Y= Diseño de un biorreactor a nivel banco para la producción de kéfir de leche.	Volumen Altura Diámetro	m <sup>3</sup> m m
<b>PROBLEMAS ESPECÍFICOS</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>HIPÓTESIS ESPECÍFICAS</b>	<b>VARIABLE INDEPENDIENTES</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADORES</b>
¿Cómo seleccionar la tecnología que permitirá la producción de kéfir de leche?	Seleccionar la tecnología que permitirá la producción de kéfir de leche.	Seleccionando una adecuada tecnología nos permitirá la producción de kéfir de leche.	X <sub>1</sub> = Tecnología para la producción de kéfir de leche.	Temperatura Acidez Tiempo de fermentación Concentración	°C pH h %
¿Cómo utilizar un modelo matemático adecuado de la cinética de reacción microbiana para la producción de kéfir de leche?	Utilizar un modelo matemático de reacción microbiana para la producción de kéfir de leche.	El uso de un modelo matemático adecuado de la cinética de reacción microbiana nos permitirá desarrollar una tecnología para la producción de kéfir de leche.	X <sub>2</sub> =Modelo matemático de la cinética de reacción microbiana para la producción de kéfir de leche.	Rendimiento del producto	%
¿Los fundamentos y procedimientos del diseño de biorreactores permitirá diseñar el biorreactor para la producción de kéfir de leche?	Analizar los fundamentos y los procedimientos de diseño del biorreactor para la producción de kéfir de leche.	El análisis de los fundamentos y procedimientos de diseño nos permitirá diseñar el biorreactor para la producción de kéfir de leche.	X <sub>3</sub> =Fundamentos y procedimientos de diseño.	Cantidad de alimentación Velocidad de agitación	m <sup>3</sup> rpm

## ANEXO N° 2

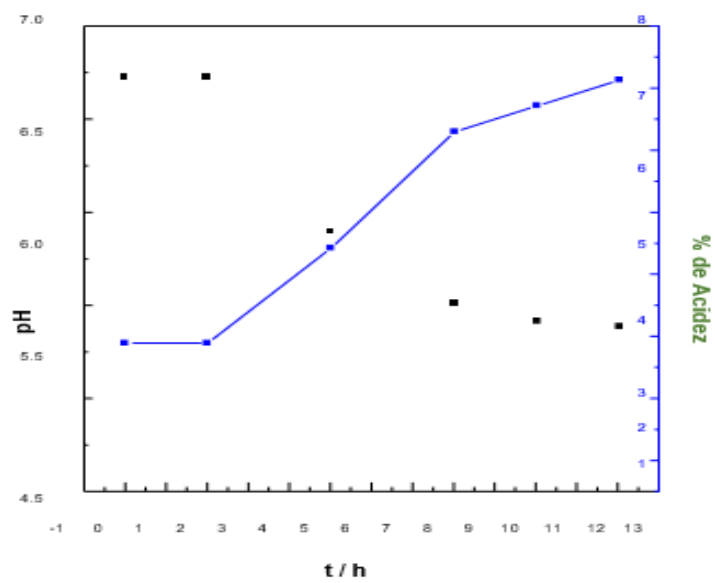
### PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN LA ETAPA DE INCUBACIÓN

Tiempo (h)	Acidez	pH	Biomasa (UFC/ml)	LOG (UFC/ml)	Fondo de escala 100 rpm R3 [0-1000]	Viscosidad (cp)
0	0,11	6,83	1,10E+06	6,058	1,43%	14,3
2	0,11	6,83	1,60E+06	6,217	1,43%	14,3
5	0,35	5,63	8,70E+06	6,940	47,85%	478,5
8	0,62	5,07	4,60E+07	7,663	69,58%	695,8
10	0,68	4,93	4,70E+09	9,676	85,28%	852,8
12	0,74	4,89	4,60E+10	10,660	89,54%	895,4

Fuente: Malma (2021)

### ANEXO 3

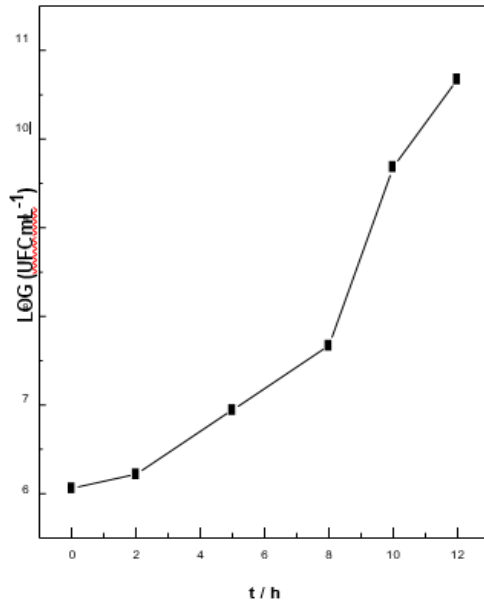
#### VARIACIÓN DEL PH Y % DE ACIDEZ EN LA ETAPA DE INCUBACIÓN



Fuente: Malma (2021)

## ANEXO N°4

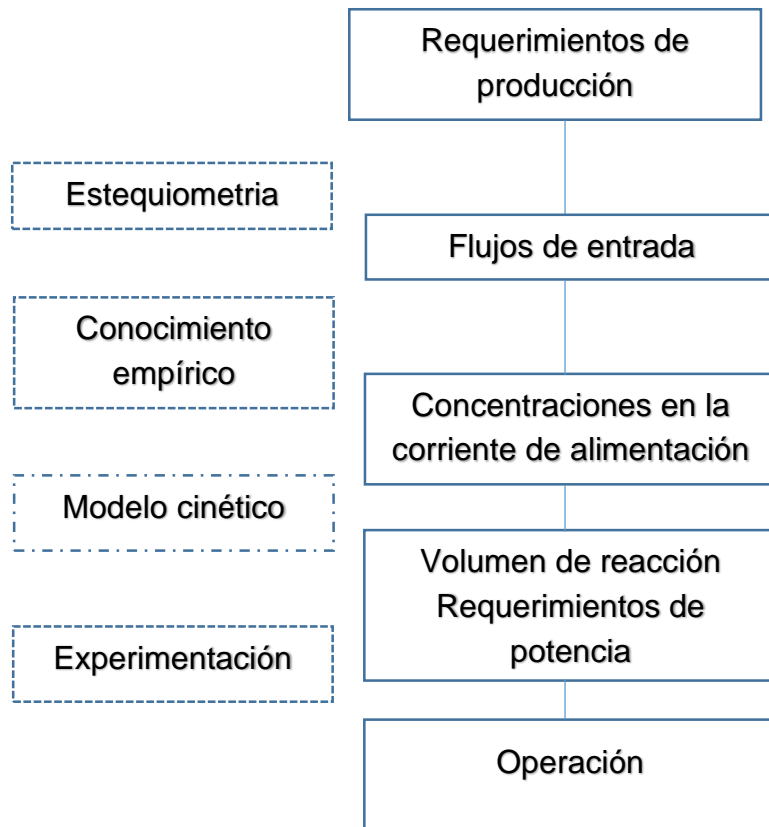
### CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA ETAPA DE INCUBACIÓN



Fuente: Malma (2021)

## ANEXO N° 5

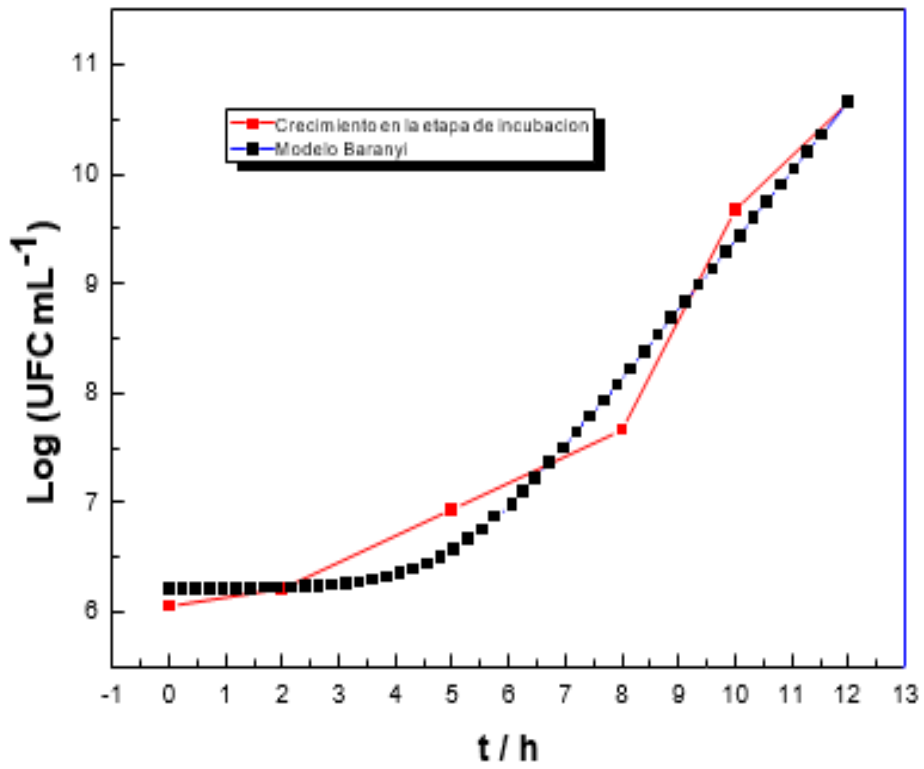
### DIAGRAMA DE FLUJO DEL MODELO CINÉTICO



Fuente: Nielsen (1994)

## ANEXO N° 6

### CURVA DE CRECIMIENTO MODELADA EN ETAPA DE INCUBACIÓN



Fuente: Malma (2021)



## ANEXO N° 7

### PARÁMETROS DEL MODELAMIENTO EN LA ETAPA DE INCUBACIÓN

Parámetro	Valor
Logaritmo inicial de la densidad de células bacterianas	6,219 ± 0,275
Velocidad máxima de crecimiento	0,635 ± 1,0851
Tiempo de latencia	5,00496 ± 1,0851

Adaptado del programa "Combase" (Universidad de Tasmania, 2019)

Fuente: Malma (2021)

## ANEXO N° 8

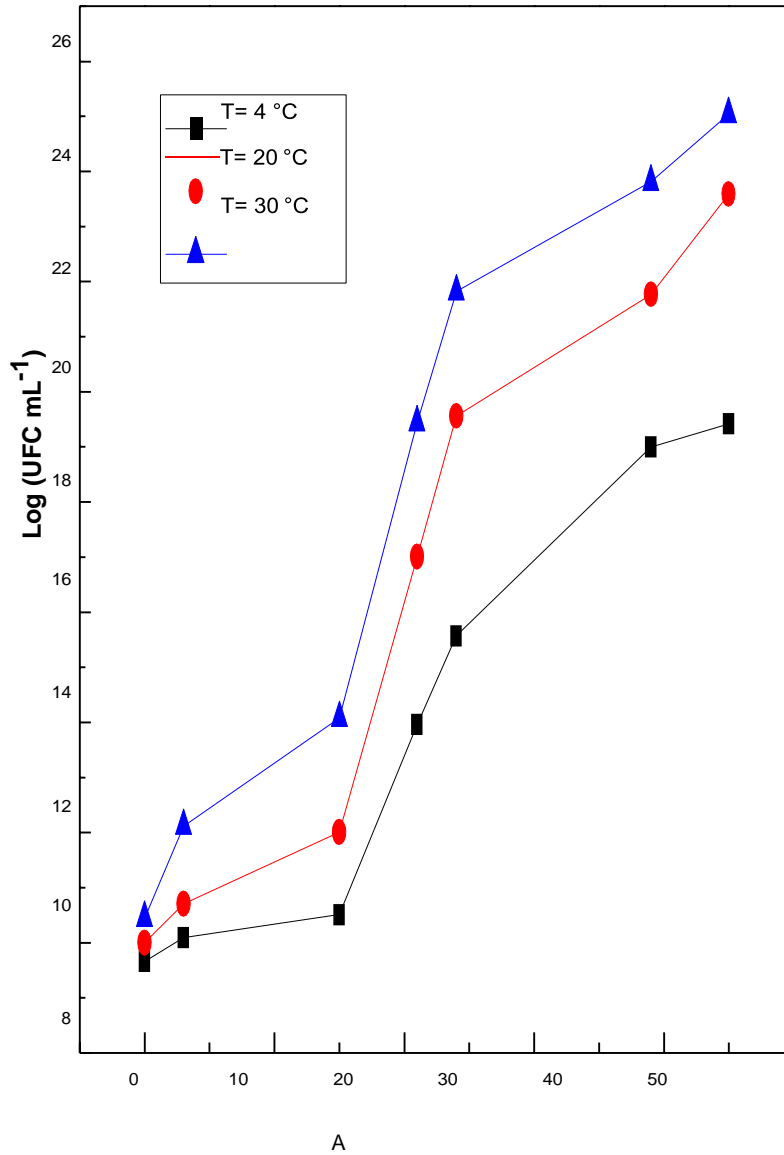
### BIOMASA A DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

N°	Tiempo (horas)	T= 4 °C		T= 20 °C		T= 30 °C	
		Biomasa (UFC/ml)	LOG (UFC/ml)	Biomasa (UFC/ml)	LOG (UFC/ml)	Biomasa (UFC/ml)	LOG (UFC/mL <sup>-1</sup> )
1	0	4,50E+09	9,653	1,00E+10	10,000	2,80E+10	10,447
2	3	1,20E+10	10,079	5,10E+10	10,708	1,30E+12	12,114
3	15	3,20E+10	10,505	1,00E+12	12,000	1,20E+14	14,079
4	21	9,10E+13	13,959	1,00E+17	17,000	2,80E+19	19,447
5	24	3,70E+15	15,568	3,60E+19	19,556	6,60E+21	21,820
6	39	9,80E+18	18,991	5,80E+21	21,763	6,50E+23	23,813
7	45	2,60E+19	19,415	3,80E+23	23,580	1,10E+25	25,041

Fuente: (Malma, 2021)

## ANEXO N° 9

### BIOMASA A DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO



Fuente: (Malma, 2021)