

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**“PROCESO HOMO FERMENTATIVO DE KÉFIR CON  
BACTERIAS PROBIÓTICAS TÍPICAS PARA  
PROLONGAR SU TIEMPO DE VIDA ÚTIL”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO QUÍMICO**

**LILIANA MERCEDES MALMA RUIZ**

Callao, 2020

PERÚ

*Carlos A. Amador*

*Liliana M. Ruiz*

## PRÓLOGO DEL JURADO

La presente tesis fue Sustentada por la señorita Bachiller **MALMA RUIZ LILIANA MERCEDES** ante el **JURADO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS** conformado por los siguientes Profesores Ordinarios:

Ing. MARÍA ESTELA TOLEDO PALOMINO	Presidente
Ing. SONIA ELIZABETH HERRERA SANCHEZ	Secretaria
Ing. CESAR GUTIERREZ CUBA	Vocal
Ing. CARLOS ALEJANDRO ANCIETA DEXTRE	Asesor

Tal como está asentado en el Libro 02 de Tesis Folio N° 143 y Acta N°324 de fecha 16 de abril de para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico en la Modalidad de Titulación de Tesis sin 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**

"De ti proceden las riquezas y la gloria. Tú lo gobiernas todo; en tu mano están el poder y la fortaleza, y es tu mano la que todo lo engrandece y a todo da estabilidad. Pues bien, oh Dios nuestro, te celebramos y alabamos tu Nombre magnífico. [...] Yahveh, Dios nuestro, todo este grande acopio que hemos preparado para edificar una Casa para tu santo Nombre, viene de tu mano y tuyo es todo." (1 Cr. 29, 12-16)

A mi mamá Mercedes Ruiz y a mi papá Juan Malma quienes han sido mi soporte e inspiración para el desarrollo de la tesis.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y a mis padres quienes han iluminado mi sendero.

A mis amigos y hermanos en la fe Angélica, Flory, Zhenia, Jenny, Rosa, Walter, Hita y Gloria por la paciencia y los consejos mientras estaba enfocada en la tesis.

A mis tíos y tías por apoyarme como a su propia hija; a Erika quien a través de sus correcciones hizo de mí una persona con más tenacidad; a Jack quien me impulsó a través de sus palabras a que me esfuerce en titularme por modalidad de sustentación.

A Victoria mi amiga y a su mamá, Ana María quienes confiaron en mí y me ayudaron a importar los cultivos desde Europa.

A mi asesor Dr. Carlos Ancieta Dextre quien desde el comienzo me brindó todo el apoyo posible en la gestión y asesoramiento de la tesis.

A mi profesor Dr Edgar Zárate, por el tiempo, paciencia y confianza al brindarme sus consejos y permitirme realizar las corridas experimentales en su laboratorio y enseñarme la pasión por la investigación.

A la Doctora Angélica Baena quien me ayudó y motivó en la redacción de la tesis.

A mis profesores que me enseñaron algo más que ingeniería y ciencias. A Javier, a Gloria, a Pizango, a José, a mis amigos y personas de la UNAC que participaron en el análisis sensorial. A la Facultad de Ingeniería Química por cultivar mi mente por un mejor futuro y a todas las personas que por una u otra manera sumaron esfuerzos para lograr la tesis.

# ÍNDICE

<b>CONTENIDO DE TABLAS .....</b>	<b>4</b>
<b>CONTENIDO DE FIGURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
<b>I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>11</b>
1.1 Descripción de la realidad problemática .....	11
1.2 Formulación del problema.....	13
1.3 Objetivos .....	13
1.4 Limitantes de la investigación .....	14
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
2.1 Antecedentes .....	15
2.1.1 Internacional .....	15
2.1.2 Nacional.....	17
2.2 Bases teóricas .....	18
2.2.1 Materia prima para la producción de kéfir .....	22
2.2.2 Bacterias acido-lácticas BAL.....	29
2.2.3 Fermentación láctica y alcohólica del kéfir.....	31
2.2.4 Cinética de crecimiento microbiano .....	33
2.2.5 Vida útil de los lácteos .....	37
2.2.6 Modelos matemáticos para estimar vida útil en lácteos .....	38
2.3 Conceptual.....	41
2.4 Definición de términos básicos .....	42
<b>III. HIPÓTESIS Y VARIABLES .....</b>	<b>46</b>
3.1 Hipótesis .....	46
3.1.1 Hipótesis General .....	46
3.1.2 Hipótesis específicas .....	46
3.2 Definición conceptual de variables.....	46
3.2.1 Operacionalización de variables .....	47
<b>IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>48</b>

4.1	Tipo y diseño de la investigación .....	48
4.2	Método de Investigación .....	51
4.2.1	Método de Ensayo Temperatura.....	51
4.2.2	Método de Ensayo Acidez .....	51
4.2.3	Método de Ensayo Viabilidad de Cultivos lácticos liofilizado .....	52
4.2.4	Método de Ensayo Viscosidad.....	53
4.3	Población y muestra.....	53
4.3.1	Población .....	53
4.3.2	Muestra.....	54
4.4	Lugar de estudio y periodo de desarrollo .....	54
4.5	Técnicas e instrumentos para la recolección de la información..	54
4.5.1	Diseño factorial. ....	54
4.5.2	Encuesta.....	54
4.5.3	Análisis Documental.....	55
4.5.4	Observación experimental. ....	55
4.5.5	Materia Prima.....	55
4.5.6	Materiales, equipos e instrumentos .....	55
4.6	Análisis y procesamiento de datos.....	56
4.6.1	Ensayo para determinar el tiempo de activación de los cultivos DVS	57
4.6.2	Análisis microbiológico en la etapa de activación .....	58
4.6.3	Análisis fisicoquímico en la etapa de activación .....	59
4.6.4	Determinación del volumen del cultivo madre en la etapa de incubación .....	59
4.6.5	Ensayo para determinar el tiempo óptimo de incubación.....	60 61
4.6.6	Cálculo del tiempo de vida útil del kéfir.....	61
4.6.7	Ajuste de la curva de crecimiento con el modelo Baranyi-Roberts 63	63
4.6.8	Cálculo de la velocidad de crecimiento por el método clásico ....	63
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
5.1	Resultados descriptivos .....	65

5.1.1	Etapa de activación.....	65
5.1.2	Modelamiento de la curva de crecimiento en la etapa de activación.....	67
5.1.3	Etapa de incubación.....	68
5.1.4	Modelamiento de la curva de crecimiento en la etapa de incubación .....	72
5.1.5	Estudio de la Estabilidad.....	73
5.1.6	Estudio del Almacenamiento Acelerado.....	77
5.2	Resultados inferenciales .....	79
5.2.1	Cálculo de la velocidad de reacción empleando el <i>Modelo Baranyi-Roberts</i> .....	79
5.2.2	Cálculo de la velocidad de reacción empleando el Modelo clásico	83
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>88</b>
6.1	Contrastación de la hipótesis .....	88
6.2	Contrastación de los resultados con estudios similares.....	89
6.3	Responsabilidad ética .....	91
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>92</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>93</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>105</b>

## CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1 Cuadro comparativo de la composición del kéfir .....	20
Tabla 2 Composición media de la leche de diferentes hembras mamíferas ....	22
Tabla 3 Microorganismos en granos de kéfir de diferentes orígenes .....	25
Tabla 4 Cultivos iniciadores primarios.....	29
Tabla 5 Modelos para describir cinéticas de crecimiento .....	35
Tabla 6 Operacionalización de Variables.....	47
Tabla 7 Equipos de laboratorio .....	55
Tabla 8 Datos extraídos de la ficha técnica de los cultivos starter .....	57
Tabla 9 Parámetros de operación para hallar volumen del cultivo madre.....	60
Tabla 10 Parámetros de operación para tiempo óptimo de incubación .....	60
Tabla 11 Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en la activación .....	65
Tabla 12 Parámetros del modelamiento en la etapa de activación .....	67
Tabla 13 Variación del % acidez según volumen del cultivo madre.....	68
Tabla 14 Costo por litro de kéfir .....	69
Tabla 15 Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en la etapa de incubación .....	70
Tabla 16 Parámetros del modelamiento en la etapa de incubación.....	72
Tabla 17 Parámetros fisicoquímicos en el estudio de la estabilidad .....	73
Tabla 18 Parámetros microbiológicos en el estudio de la estabilidad .....	75
Tabla 19 Análisis sensorial en el estudio de la estabilidad .....	76
Tabla 20 Porcentaje acidez a diferentes temperaturas de almacenamiento ....	77
Tabla 21 Variación del pH a diferentes temperaturas de almacenamiento .....	78
Tabla 22 Biomasa a diferentes temperaturas de almacenamiento .....	79
Tabla 23 Parámetros de modelamiento .....	80
Tabla 24 Velocidad de crecimiento según la temperatura .....	80
Tabla 25 Vida útil estimada mediante modelo de Baranyi-Roberts.....	82
Tabla 26 Velocidad de crecimiento a 4°C .....	83
Tabla 27 Análisis estadístico de velocidad de crecimiento a 4 °C.....	83
Tabla 28 Velocidad de crecimiento a 20°C .....	84
Tabla 29 Análisis estadístico de velocidad de crecimiento a 20 °C.....	84

Tabla 30 Velocidad de crecimiento a 30°C .....	84
Tabla 31 Análisis estadístico de velocidad de crecimiento a 30 °C.....	85
Tabla 32 Velocidad de crecimiento según la temperatura .....	85
Tabla 33 Vida útil mediante modelo clásico .....	86

## CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del kefirán .....	27
Figura 2. Fermentación láctica .....	32
Figura 3. Fermentación alcohólica .....	33
Figura 4. Curva de crecimiento de un cultivo .....	34
Figura 5. Definición conceptual de variables .....	46
Figura 6. Diseño de la Investigación .....	50
Figura 7. Diagrama de flujo del proceso en la etapa de activación del kéfir ....	58
Figura 8. Diagrama de flujo del proceso en la etapa de incubación del kéfir ...	61
Figura 9. Diagrama de bloques para determinar el tiempo de vida útil por el método de estabilidad .....	62
Figura 10. Diagrama de bloques para determinar el tiempo de vida útil por el método de almacenamiento acelerado .....	63
Figura 11. Evolución de la viscosidad en la etapa de activación.....	66
Figura 12. Variación del pH y % de acidez en la etapa de activación .....	66
Figura 13. Crecimiento microbiano en la etapa de activación .....	67
Figura 14. Curva de crecimiento modelada en etapa de activación .....	68
Figura 15. Variación del % acidez según volumen del cultivo madre.....	69
Figura 16. Viscosidad versus tiempo en la etapa de incubación.....	70
Figura 17. Variación del pH y % de acidez en la etapa de incubación .....	71
Figura 18. Crecimiento microbiano en la etapa de incubación.....	71
Figura 19. Curva de crecimiento modelada en etapa de incubación.....	72
Figura 20. Viscosidad versus tiempo en el estudio de la estabilidad .....	74
Figura 21. Variación del pH y % de acidez en el estudio de la estabilidad .....	74
Figura 22. Crecimiento microbiano en el estudio de la estabilidad .....	75
Figura 23. Influencia de los parámetros del análisis sensorial sobre los consumidores.....	77
Figura 24. Porcentaje acidez versus tiempo a diferentes temperaturas de almacenamiento.....	78
Figura 25. pH versus tiempo a diferentes temperaturas de almacenamiento ..	78

Figura 26. Gráfico de la biomasa a diferentes temperaturas de almacenamiento .....	79
Figura 27. Vida útil en función de la temperatura – modelo Baranyi.....	81
Figura 28. Vida útil en función de la temperatura – modelo clásico .....	86

## RESUMEN

El presente trabajo propone el proceso homofermentativo para obtener kéfir utilizando bacterias probióticas típicas que prolonguen el tiempo de vida útil, para lo cual se definió los parámetros de control en el proceso: tiempo de activación, tiempo de incubación y concentración de cultivo madre para producir kéfir, así mismo, se caracterizó el producto final mediante propiedades fisicoquímicas (viscosidad, % de acidez y pH), microbiológicas (cantidad de células viables-UFC/mL) y presencia de bacterias patógenas.

Se realizó un estudio de vida útil mediante el método de estabilidad y el método de almacenamiento acelerado (método cinético), El primer método consistió en medir la cantidad de células viables, variación de viscosidad, pH y % acidez durante 36 días, así mismo, se realizó en paralelo un análisis sensorial sin escala hedónica, dando como resultados 30 días de preferente consumo. El método de almacenamiento acelerado fue realizado, en 48 horas, sometiendo a tres temperaturas (4 °C, 20 °C y 30 °C) de almacenamiento, para este método se utilizó los modelos Baranyi-Roberts y el método clásico para determinar la velocidad de crecimiento. Finalmente, mediante la ecuación de Labuza y Riboh se determinó que el tiempo de vida útil fue de 30 días y 40 días respectivamente.

Palabras clave: *homofermentativo, probiótico, kéfir, vida útil*

## ABSTRACT

This paper proposes the homofermentative process to obtain kefir using typical probiotic bacteria that prolong the lifespan, for which the control parameters in the process were defined: activation time, incubation time and mother culture concentration to produce kefir, in addition, the final product was characterized by physicochemical properties (viscosity, % acidity and pH), microbiological (number of viable cells UFC/mL) and presence of pathogenic bacteria.

A life study was performed using the stability method and the accelerated storage method (kinetic method), In the first method the amount of viable cells was measured, viscosity variation, pH and % acidity for 36 days, as well, in parallel a sensory analysis without hedonic scale was performed, resulting in 30 days of preferential consumption. The accelerated storage method was performed, in 48 hours, at 3 temperatures (4 °C, 20 °C, 30 °C) of storage, for this method the Baranyi-Roberts models and classic method were used to determine the growth rate. Finally, by the equation of Labuza and Riboh it was determined that the lifespan was 30 days and 40 days, respectively.

Keywords: *homofermentative, probiotic, kefir, lifespan*

## INTRODUCCIÓN

El kéfir es una bebida que se consume desde tiempos antiguos en el Cáucaso y en Europa, pero ha sido tal su difusión que ha llegado al continente americano bajo los nombres de kephir, kiaphur, kefer, knapon, kepi y kippi. Este producto puede realizarse con cultivos iniciadores o con granos de kéfir tradicionales, así mismo, se puede escoger el tipo de leche: leche de camella, leche de yegua, leche de cabra y leche de vaca. Según el tipo de gránulo de kéfir y sustrato que se utilice puede llamarse: kéfir de leche, kéfir de agua y kéfir de kombucha, siendo el más conocido el kéfir de leche.

La producción de kéfir comercial puede darse a través del método ruso que consiste en un proceso de fermentación en serie, o por el método de las culturas puras empleando cultivos iniciales. La obtención de un producto de calidad depende de cultivos que permitan controlar la microflora involucrada, y obtener altos valores de bacterias viables.

Según estudios sobre el kéfir, han catalogado a este producto como probiótico, es decir contiene bacterias promotoras para la salud, razón por la cual se tiene un gran interés por comercializarlo. Los granos de kéfir contienen al polisacárido kefirán, compuesto por galactosa y lactosa en proporciones iguales, este heteropolisacárido, como también se le conoce, tiene excelentes propiedades reológicas y viscoelásticas, utilizándose como aditivo en productos fermentados. La presente tesis presenta el proceso homofermentativo para producir kéfir, utilizando bacterias típicas probióticas para prolongar el tiempo de vida útil.

# **I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

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

El conocimiento actual del kéfir va desde criterios generales hasta específicos, considerando lo primero nos permite opinar que es un alimento beneficioso, con microorganismos probióticos y sustancias orgánicas funcionales. Respecto a lo segundo, se trata de un producto en el que actúa una compleja simbiosis microbiana de bacterias y levaduras.

El kéfir elaborado a nivel industrial, a través de cultivos naturales presenta un proceso de obtención largo y requiere una gran inversión de producción, además su crecimiento microbiano es difícil de controlar ya que se desconoce los microorganismos que lo caracterizan porque estos varían de acuerdo con el lugar de donde provienen y el tipo de sustrato que use.

Los granos de kéfir tienen una composición compleja de especies microbianas que se clasifican en bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas y levaduras asimiladoras de lactosa y no lactosa. Las variedades en las poblaciones de microorganismos que conforman los gránulos del kéfir hacen difícil establecer una composición definida del producto. Así mismo, dependiendo del lugar, este producto presenta características organolépticas distintivas proporcionadas por el tipo de microorganismos asociados y la calidad de la leche utilizada. Es probable que los microorganismos de la superficie causen mayor impacto en el proceso de fermentación.

Las condiciones del proceso de fermentación como: el tiempo de fermentación, la temperatura, el grado de agitación, el tipo de leche, la relación en el inóculo de gránulo/leche y la distribución de los microorganismos, entre otras, impactan directamente en el crecimiento de los granos de kéfir, haciendo variar la proporción de microorganismos que se encuentran en los gránulos iniciales con los que están presentes en el producto final.

Los gránulos de kéfir están en continuo crecimiento por ser microorganismos vivos; tras la fermentación los gránulos incrementan su masa entre un 5 % a 7 %. Los nódulos que se crean se parten por gemación y poco a poco duplican su tamaño causando la necesidad de contar con mayor aporte energético y espacio. En Perú, la bebida de kéfir no está disponible a nivel comercial debido a la ausencia de industrialización de este producto, por lo que tradicionalmente se suministran de persona en persona. Esto trae como consecuencia, contaminación del producto que llega a ser perjudicial para el consumidor.

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. Después de una búsqueda exhaustiva de caracterización de productos comerciales, la presente tesis muestra un proceso homofermentativo de kéfir utilizando bacterias probióticas típicas para prolongar su tiempo de vida útil, un producto elaborado a base de cultivos seleccionados, en comparación con el kéfir natural.

Se establece que este tipo de producto fue convenientemente parametrado y esto se logró con procesos homofermentativos debido a que se produce un solo indicador metabólico que favorece su elaboración a escala industrial; así mismo, las condiciones organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas permitieron una mayor estabilidad en función del tiempo otorgándole un tiempo de vida útil mayor y nutricionalmente efectivo, asociado a la actividad probiótica de sus microorganismos.

## **1.2 Formulación del problema**

### 1.2.1 Problema general

¿Será factible el proceso homofermentativo de kéfir con bacterias probióticas típicas para prolongar su tiempo de vida útil?

### 1.2.2 Problemas específicos

¿Cuáles son los parámetros de control para la obtención de kéfir?

¿Cuál es la cinética de crecimiento microbiano de las bacterias probióticas homofermentativas para la producción de kéfir?

¿Cuáles son los parámetros fisicoquímicos en la elaboración del kéfir con bacterias probióticas?

## **1.3 Objetivos**

### 1.3.1 Objetivo general

Determinar el tiempo de vida útil del kéfir usando bacterias probióticas típicas mediante un proceso homofermentativo.

### 1.3.2 Objetivos específicos

Determinar los parámetros de control para la obtención del kéfir.

Determinar la cinética de crecimiento microbiano para la producción de kéfir.

Determinar los parámetros fisicoquímicos en la elaboración del kéfir.

## **1.4 Limitantes de la investigación**

### Teórico

El limitante en esta investigación fue la poca información sobre la caracterización de kéfir utilizando cultivos iniciadores. Las literaturas sólo indican la elaboración de kéfir con cultivos naturales.

### Temporal

La presente tesis fue realizada entre los meses de febrero a diciembre del año 2019.

### Espacial

Esta investigación 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 Internacional**

El kéfir es una bebida láctea que es consumida en todo el mundo, especialmente en Europa. La obtención de un producto de calidad a escala comercial requiere la estandarización de procesos para extender la vida útil del producto, mediante la utilización de cultivos seleccionados y eficientes, se debe proveer los nutrientes necesarios y altos valores de bacterias viables mediante el control de la microflora involucrada. Adicionalmente, el Kéfir debe poseer buenas propiedades químicas y organolépticas. (Salas & Valadez, 2014).

Salas y Valadez (2014) caracterizaron e identificaron molecularmente un grupo de bacterias aisladas de kéfir proveniente de diferentes muestras artesanales de la Ciudad de Texcoco, Estado de México, México. El análisis se realizó mediante la determinación de su capacidad acidificante, utilizando marcadores genético-moleculares y comparando las secuencias del gen 16S del rADN. Estos métodos resultaron adecuados para caracterizar e identificar las bacterias ácido-lácticas, encontrando así que el kéfir producido presenta bacterias ácido-lácticas de forma bacilar, Gram positivas, catalasas negativas, sp esporulación y alcanza un pH entre 4,9 a 6,1. La tecnología empleada para caracterizar bacterias aisladas del kéfir será útil para aplicar en la presente tesis.

Así mismo, en Ecuador, existe la necesidad de industrializar y comercializar el kéfir de agua, razón por la cual se realizó su caracterización química y microbiológica. Monar y colaboradores (2014) establecieron las características químicas adecuadas para la industrialización y comercialización del kéfir de agua; también determinaron la concentración de bacterias ácido-lácticas y recuento de levaduras presentes en el kéfir. En este estudio se elaboraron 3 tipos de kéfir de agua según la formulación base que contenía: agua, endulzante y típicos; se varió el tipo de endulzante y el tiempo de fermentación (24, 48 y 72

h). Los endulzantes utilizados fueron: panela, miel de abeja y azúcar blanca granulada. Los resultados muestran que el tratamiento con mayor aceptación debido a sus características químicas, microbiológicas y sensoriales fue el de miel de abeja a las 48 h de fermentación. La concentración de bacterias ácido-lácticas presentes en el kéfir del agua ecuatoriana mediante el recuento de BAL fue de  $4 \times 10^9$  UFC/mL y el recuento de levaduras fue de  $3 \times 10^7$  UFC/mL. Se encontró que la cantidad de bacterias ácido lácticas fue mayor a la cantidad requerida ( $< 10^6$  UFC/mL), pero las de levaduras presentes en el Kéfir fue menor, no siendo suficiente para ejercer un efecto probiótico. La metodología de la presente investigación ayudará a analizar y determinar el modelo matemático de la velocidad de crecimiento microbiano para la producción de kéfir.

La industrialización y comercialización de productos a base de Kéfir se ha visto limitada, debido a que este tipo de consorcio microbiano es muy variable en su composición, además presenta una cinética de crecimiento atípica, por este motivo el incremento de biomasa es lento a lo largo del tiempo (Apar, y otros, 2016).

Ramírez y colaboradores (2016) optimizaron los parámetros de fermentación, usando leche de vaca como sustrato, enfocada al incremento de la producción de biomasa de gránulos de kéfir y determinaron que entre el 5 % y 10 % de la población microbiana de los granos de kéfir son levaduras. En este trabajo de investigación se realizaron fermentaciones con leche de vaca y diferentes concentraciones de inóculo y se incubaron a 37 °C por 24 h. Se determinó la curva de crecimiento de gránulos fermentando leche de vaca con  $10 \text{ g L}^{-1}$  de gránulos de kéfir y se incubó a 37 °C por 48 h. Además, se evaluó el efecto de la adición de levadura, fermentando leche de vaca con 2 % de extracto de levadura y 2 % de aislado de proteína de suero de leche con un inóculo  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Por último, se evaluó el efecto de la temperatura para el caso anterior y usando leche sola con inóculo  $10 \text{ g L}^{-1}$ . (Ramírez-Benítez, y otros, 2016). Los resultados fueron los siguientes: se observó un comportamiento diáuxico de los gránulos a una concentración de inóculo de  $10 \text{ g L}^{-1}$ , con un aumento de la cantidad de

biomasa del 59,14 % con una fase de adaptación entre 8 y 24 h del cultivo. Adicionalmente se observó un aumento de producción de biomasa del 95 % cuando se utiliza extracto de levadura y un 89 % cuando se utiliza aislado de proteína de suero de leche. Cuando la temperatura se incrementó de 27 °C a 37 °C se obtuvo una disminución en la producción de la biomasa, demostrando así la naturaleza compleja del crecimiento de los gránulos de kéfir. (Ramírez-Benítez, y otros, 2016). Esta investigación muestra el complejo crecimiento microbiano que presenta el kéfir, el cual carece de bacterias típicas y desconocimiento de microbiota presente en los gránulos. Así mismo, indica que los parámetros fisicoquímicos a controlar son temperatura y concentración de inóculo para una producción de biomasa óptima. Los parámetros de control para la obtención de kéfir que utiliza en esta investigación servirán de apoyo para la presente tesis

### 2.1.2 Nacional

Arévalo y Arias (2014) aprovechando que el lactosuero es un desecho industrial con alto poder de contaminación que exige una demanda bioquímica entre 30000 y 50000 mg L<sup>-1</sup>, estudiaron 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. Por lo que tomaron como variables de estudio la velocidad de agitación en el proceso de fermentación y el tipo de flujo, encontrando así que la producción de biomasa óptima se da cuando los parámetros cinéticos de fermentación (velocidad de agitación y tipo de flujo) están adecuadamente controlados en la fermentación. Sus resultados muestran 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, siendo el más adecuado el flujo laminar por fines económicos y para no causar daños a los gránulos (Arévalo & Arias, 2014). En esta investigación se utilizó 4 % de

gránulos de kéfir respecto al volumen del medio de cultivo, según lo recomendado por Sasazki (1995, págs. 32-38), lo cual habilita otra opción de concentración para el inóculo.

Hasta el momento no se han reportado estudios de vida útil del kéfir, pero considerándolo una bebida láctea, similar al yogur, se podría utilizar las técnicas que se han empleado para el cálculo de vida útil del yogur, así por ejemplo para Sánchez y colaboradores (2013) la vida útil del yogur Bionatural marca “La Molina” fue de 29 días utilizando el método del Valor  $Q_{10}$  y de 44 días utilizando la metodología de análisis de supervivencia. Los ensayos microbiológicos y fisicoquímicos no son suficientes para la determinación del tiempo de vida del yogur, es necesaria una evaluación sensorial, el catador identifica hasta que límite el producto es aceptado o en qué momento pierde sus características organolépticas que lo hace inaceptable. (Sánchez, Cerrón, Canchuricra, & Aquino, 2013)

## **2.2 Bases teóricas**

El kéfir se define como bebida láctea fermentada de consistencia cremosa, que contiene carbonato de sodio y etanol en pequeñas cantidades. Oriunda de los Balcanes, en Europa del Este y en el Cáucaso, tal como se describe en las investigaciones de Prado y colaboradores (2015), así como Salas y Valadez (2014). El Kéfir por sus propiedades probióticas es un suplemento nutricional de interés comercial (Lopitz- Otsoa, Rementería, Elguezabal, & Garaizar, 2006). Esta bebida posee un consorcio de microorganismos como bacterias y levaduras. Dentro de la población bacteriana se incluye lactobacilos, lactococos, leuconostocos y aceterobacterias y en la población de levaduras tanto de fermentación de lactosa como de fermentación sin lactosa.

En la fabricación del yogur se utilizan solamente cultivos bacterianos (bacterias ácido lácticas), en el kéfir se utiliza un consorcio de bacterias y levaduras, el uso de levaduras promueve la formación de etanol que tiene una influencia en las características organolépticas del Kéfir. Lo que distingue al Kéfir de otras leches

fermentadas es la producción de CO<sub>2</sub> producto de la fermentación alcohólica (Siegenthalerm.E., 1964). El ácido carbónico, compuestos aromáticos y el etanol generado por las levaduras durante la fermentación le confieren un sabor ácido y efervescente. (Salas & Valadez, 2014).

Desde tiempos remotos, en los países soviéticos, el kéfir ha sido relacionado con la salud, destacando sus propiedades como antitumoral, antimicótico y antibacteriano. (Prado, y otros, 2015). El kéfir es considerado un alimento probiótico debido a que restituye y estabiliza la flora intestinal. Al mismo tiempo, actúa como matriz efectiva para el suministro de microorganismos probióticos. Las enfermedades que se han tratado con kéfir comprenden a los sistemas: respiratorio, digestivo (úlceras, infecciones intestinales crónicas, hígado, vesícula biliar), excretor (riñones) y otras dolencias como la diabetes juvenil, también se ha usado para prevenir el cáncer. (Gálvez Viteri, Heras Solíz , & Romo Leroux, 2012). A continuación, se presenta la Tabla 1 en la que se muestra la comparación de sustancias contenidas en el kéfir, leche entera, leche descremada y yogurt.

Diversos autores describen el proceso de producción utilizando granos de kéfir natural, con algunas modificaciones. La producción de kéfir se realiza en 4 etapas: La incubación es la primera etapa, para adquirir el cultivo original (Athéna Zourari, 1988) se utiliza 5 % del inóculo, a 20 °C, por un tiempo de 20 h, siguiendo así la tradición caucásica para optimizar homogeneidad y textura del producto. Transcurrido el tiempo y las condiciones de operación, pasará por un proceso de filtrado separando así el kéfir de los granos de kéfir. Los granos de kéfir vuelven a ser lavados e inoculados en una nueva leche. El tamizado (cultivo original) se inocula e incuba con nueva leche a las condiciones mencionadas líneas arriba, obteniendo así la levadura la cual será utilizada en la preparación del kéfir. Sasazki (1995) y Ramírez (2016) solo consideran un proceso de incubación.

La segunda etapa comprende la inoculación de la levadura obtenida en la primera etapa, en leche a razón del 2 % - 8 % (siendo el 5 % el óptimo); seguida

de incubación a 20 °C – 22 °C entre 8 h – 20 h (Athéna Zourari, 1988). Sasazki (1995) recomienda incubarlo a 25°C hasta una acidez de 86 °D (8,6 % de acidez) La tercera etapa consiste en el enfriamiento de la cuajada. Cuando el kéfir alcanza un pH entre 4,5 y 4,6, el producto se somete a enfriamiento entre 4 °C - 6 °C por 20 minutos máximo. La presencia de aire en la cuajada aumenta el riesgo de estratificación del producto, por lo que hay que evitarlo durante todo el proceso. Sasazki (1995) y Ramírez (2016) no realizan esta etapa.

**Tabla 1**

*Cuadro comparativo de la composición del kéfir*

Contenido	Kéfir	Leche Entera	Leche Descremada	Yogur
Kcal	61,00	64,00	35,00	61,00
Proteínas	3,30	3,30	3,50	3,30
Lípidos (g)	3,50	3,50	0,10	3,50
Glúcidos (g)	4,00	4,80	4,90	4,00
Agua (g)	87,50	87,50	90,58	7,50
Colesterol (mg)	11,00	11,00	---	11,00
Sodio (mg)	48,00	48,00	50,00	48,00
Potasio (mg)	157,00	157,00	163,00	157,00
Calcio (mg)	120,00	120,00	125,00	120,00
Fósforo (mg)	92,00	92,00	96,00	92,00
Magnesio (mg)	12,00	12,00	12,00	12,00
Hierro (mg)	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina A (mg)	31,00	31,00	1,00	31,00
Vitamina E (mg)	0,20	0,20	---	0,20
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)	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina B6 (mg)	0,05	0,05	0,05	0,05
Vitamina C (mg)	1,00	1,00	1,00	1,00

Fuente: Gálvez, Heras y Romo (2012)

La cuarta etapa está dada por la maduración y envasado. La maduración se realiza entre 8 °C a 16 °C durante 12 h a 6 días, hasta alcanzar un pH de 4,3 – 4,4. El envasado debe realizarse en recipientes con tapones de alta presión que permitan la evacuación de una cierta cantidad de gas, ya que la producción de CO<sub>2</sub> continúa durante la conservación a bajas temperaturas y podría ejercer una

fuerte presión sobre el embalaje. Sasazki (1995) realizó la maduración a 25 °C por 24 h, alcanzando una acidez de 110 °D (11 % de acidez).

El proceso de obtención de kéfir es largo, según lo descrito anteriormente, esto trae como resultado gran inversión en la producción ya que necesita un mayor consumo de energía, mayor cantidad de horas de trabajo, etc.

La calidad del kéfir comprende a todas sus propiedades tales como: composición química, cantidad y calidad de la microflora, reología y características organolépticas. Todo esto está relacionado con la composición y la calidad de la leche y los granos de kéfir, pero también con las condiciones de producción y la tecnología utilizada (Athéna Zourari, 1988). Los tiempos de producción dependen directamente de la composición del inóculo y la concentración en leche (Sasazki-Tamaki, 1995). El kéfir presenta características organolépticas aceptables dependiendo del tipo de gránulo de kéfir y leche que se utilice (Salas & Valadez, 2014).

El grupo de investigación y desarrollo de Danone en París ha estado investigando el kéfir durante algunos años. Esta bebida fermentada es poco conocida fuera de Europa oriental. Uno de los principales problemas con el kéfir ha sido la dificultad de producirlo a gran escala. En Rusia, ese problema parece haber sido superado y Lifeway Foods, con sede en Chicago, también tiene un proceso de producción confiable a gran escala. (Roberts & Yarunin, 2018)

Duitschaever et al. (1987), Kuo y Lin (1999), Tamime et al. (1999) coinciden en afirmar que en la producción comercial de kéfir se utiliza un cultivo estándar que se obtiene a partir de leche descremada que ha sido calentada a 95 °C por 30 min, la inoculación se realiza a una temperatura de 25 °C por un periodo entre 1 a 2 días. Posteriormente los granos son recuperados y utilizados para un nuevo cultivo estándar. El cultivo estándar obtenido es inoculado en 5 % de leche entera que ha sido previamente tratada a 85 °C durante 30 min. La siguiente etapa consiste en la fermentación dada entre 12 a 18 h a una temperatura de 22 °C,

finalmente la maduración ocurre entre 1 a 3 días a 10 °C antes de su envasado y comercialización. (Anselmo, Viora, & Lausada, 2001, pág. 92)

### 2.2.1 Materia prima para la producción de kéfir

El kéfir se obtiene a partir de una doble fermentación de la leche producida por los gránulos de kéfir. Así mismo, para Bensmira, Nsabimana y Jiang (2010) esta bebida se puede obtener a partir de cultivos iniciales o con el producto que queda después de la eliminación de los granos de kéfir. Generalmente se emplea leche de vaca por su alto valor nutricional debido a su contenido en grasas y nutrientes, además presenta una composición química similar a la leche humana, tal como se puede apreciar en la tabla 2.

**Tabla 2**

*Composición media de la leche de diferentes hembras mamíferas*

Tipo de leche (por 100g)	Sólidos o extracto seco total (EST)					EST	Agua
	Grasa	+ H.C.	+ Caseína	+ Albúmina	Ceniza		
Humana	3,74	+ 6,37	+ 0,80	+ 1,21	+ 0,30	12,42	87,58
Vaca	3,68	+ 4,94	+ 2,88	+ 0,51	+ 0,72	12,73	87,27
Cabra	4,07	+ 4,64	+ 2,87	+ 0,89	+ 0,85	13,32	86,68
Oveja	7,90	+ 4,17	+ 4,17	+ 0,98	+ 0,93	18,15	80,71
Búfala	7,51	+ 4,77	+ 4,26	+ 0,46	+ 0,84	17,84	82,16
Camella	5,38	+ 5,39	+ 3,49	+ 0,38	+ 0,74	15,38	87,13
Llama	3,15	+ 5,60	+ 3,00	+ 0,90	+ 0,80	13,45	86,55
Burra	2,53	+ 6,19	+ 0,79	+ 1,06	+ 0,47	11,04	89,03
Yegua	1,14	+ 5,87	+ 1,30	+ 0,75	+ 0,36	9,42	90,58
Reno hembra	22,46	+ 2,81	+ 8,38	+ 3,02	+ 0,91	37,58	63,30
Perra	9,26	+ 3,11	+ 4,15	+ 5,57	+ 1,49	23,58	77,00

Fuente: Astiasarán y Alfredo (2003)

Los productos lácteos existen desde antaño, sin embargo, eran escasos debido al desconocimiento de los métodos de conservación de la leche, los elementos solubles no podían ser utilizados en la fabricación de productos lácteos, solo los elementos insolubles como la caseína y la grasa podían ser conservados. La conservación de la leche es una necesidad tanto económica como social, permitiendo el transporte de esta a regiones con escasos recursos. Gracias a los

avances tecnológicos, es posible la conservación de la leche casi de forma indefinida en su forma íntegra o liofilizada. (Alais & Godina, 2003, pág. 10)

La *leche* es un líquido de color blanco y sabor dulce, presenta una composición química compleja, y un pH cercano a 7. Las hembras de los mamíferos producen la leche por excreción de las glándulas mamarias posterior al alumbramiento de la cría. (Alais & Godina, 2003). La leche es un líquido que contiene como parte de su composición química sales de Ca, P, Cl, Na, K y S, proteínas como la caseína, lactosa y globos de grasa (Nutrición, 2000). La leche es un sistema coloidal de tres fases (solución, suspensión y emulsión), siendo la grasa en agua, la emulsión, los carbohidratos disueltos en agua la solución y las sustancias proteicas presentes en el agua, la suspensión (Alais & Godina, 2003, pág. 21) Cuando solo se llama “leche” y no detalla la especie animal de la que proviene, se considera leche de vaca (Agudelo Gomez & Bedoya , 2005).

La leche de vaca, oveja y cabra han sido utilizadas mayormente para alimentar a las personas, en otros países se consume también leche de búfala domesticada, reno, cebú y yegua. Así también, el ser humano ha consumido leche de burra con fines medicinales. Cabe resaltar que la leche de vaca gana por partida doble: sabor que la constituye y aporte nutricional que le brinda al infante (Oliver, 1943). El alto consumo a nivel mundial (excede los  $400 \times 10^9$  litros anuales abarcando un mercado de US\$ 400 billones como sector lácteo) ha exigido altos estándares de calidad, pero últimamente se ha buscado propiedades adicionales para la salud de los consumidores denominadas “funcionales o nutraceuticas”, encontrándose compuestos bioactivos como lípidos, proteínas, azúcares y sus derivados (Carvajal, 2017).

Desde el punto de vista legal el Ministerio de Cultura y Riego, mediante el Decreto supremo 007-2017 del 26 de junio del 2017, y según el Artículo 2 del capítulo 1, define que “la leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros, obtenida mediante uno o más ordeños, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración

ulterior” (MINAGRI, 2017). Veisseyre (1988) define a la leche, desde el punto de vista dietético, como un alimento puro y perfecto, resaltando las características de la caseína (proteína principal de la leche), la cual contiene aminoácidos esenciales y es fuente de calcio fósforo y riboflavina (vitamina B12), aporta en las exigencias de vitamina A y B1 (tiamina). Adicionalmente contiene lípidos y lactosa que constituyen aporte energético. PASEIRO, (1980) define a la leche químicamente como un fluido completo. Presenta entre 82 % a 82,5 % de agua, alcanzando en consecuencia entre 12 % a 13 % de sólidos totales. Los sólidos no grasos (excluyendo agua y grasa) se aproximan a 9 %, corroborando así, el 3 % de grasa que posee. (Agudelo Gomez & Bedoya , 2005).

En la publicación de Salas y Valadez (2014) se define a *los gránulos de kéfir* como consorcios simbióticos dependiendo de su procedencia puede ser bacterias ácido lácticas, levaduras y algunas veces bacterias acéticas, así como hongos (Ver tabla 3) (Jianzhong, 2009), (Pogačić, 2013).

Existen tres tipos de granos de kéfir conteniendo las mismas especies microbianas según el sustrato en el que se encuentre: de agua, de leche y kombucha, siendo el más comercializado el kéfir de leche por su sabor característico (Perez, 2013) Esta microbiota se clasifica en cuatro grupos: bacterias lácticas homofermentativas, bacterias lácticas heterofermentativas, levadura asimiladora de lactosa y levadura no asimiladora de lactosa (Cheirsilp & Radchabut, 2011); haciendo de esta una composición compleja de microbiota. En la bebida fermentada solo hay un 20 % de *Lactobacillus* tales como: *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbruckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* y *L. kefiranofaciensson*; así como 80 % de *Lactobacillus kefiri*. (Zanirati, y otros, 2015) (Yüksekdağ, Beyatli, & Aslim, 2004)

**Tabla 3***Microorganismos en granos de kéfir de diferentes orígenes*

Microorganismos	Fuente-País	Referencia
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp., <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Acetobacter</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Lactococcus Jactis</i> ssp. <i>Jactis</i> biovar <i>diacetyllactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> .	Kefir grains and beverage - Argentina	Garrote et al.2001; Londero et al., 2012; Hamet et al., 2013; Diosma et al., 2014 .
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Acetobacter- syzygii.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Acetobacter</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp. <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> ssp. <i>kefirgranum</i> , <i>Lactobacillus parakefiri</i>	Kefirgrains - Brazil	Miguel et al. 2010; Leite et al., 2012; Zanirati et al., 2015
<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus de brueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> . <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> ssp <i>pseudopantarum</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida inconspicua</i> , <i>Candida maris</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Kefir grains and beverage - Bulgaria	Simova et al., 2002
<i>Acetobacter acetic</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> . <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> . <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Brettanomyces</i> sp., <i>Gandida</i> sp. <i>SaccharomycOoes</i> sp., <i>Acetobacter rancens</i>	Kefirbeverage- China	Yang et al., 2007
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> . <i>Dekkera anomala</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> . <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Acetobacter</i> sp., <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Acetobacter fabarum</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>Acetobacter orientalis</i>	Kefirgrains - Italy	Garofaki et al., 2015
<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp., <i>Zygosaccharomyces</i> sp., <i>Gandida</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp	Kefir grains - South Africa	Witthuhn et al., 2004

Fuente: Prado et al. (2015, pág. 3)

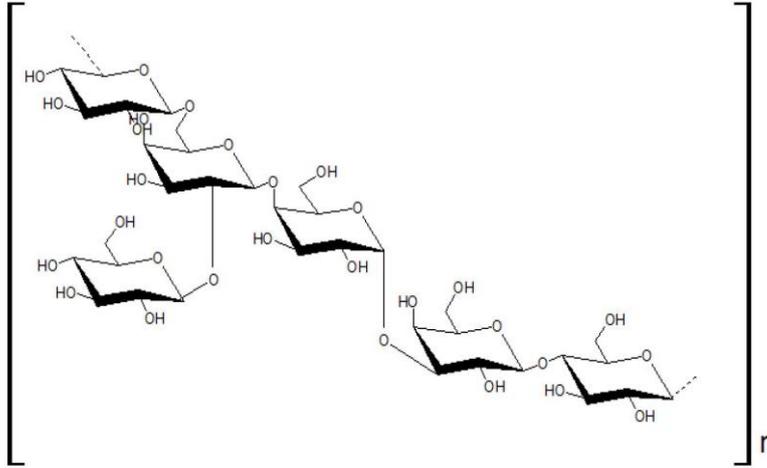
Los granos de kéfir se multiplican por división (gemación), y son obtenidos a partir de la reproducción de gránulos formados previamente (Garrote, Abraham, & De Antoni, 2001). La estructura soporte seguirá creciendo y los microorganismos se multiplicarán mientras la colonia microbiana sea alimentada por el substrato (leche). Cada grano de kéfir se separa y comienza a crecer, multiplicándose indefinidamente. (Margulis, y otros, 2014) y se encuentran agrupados dentro del heteropolisacárido kefirán (Lopitz- Otsoa, Rementería, Elguezabal, & Garaizar, 2006, pág. 67). Los granos de kéfir como se mencionó anteriormente desprenden un polisacárido de color amarillo claro, con una alta solubilidad en agua denominado kefirán o kefirano, compuesto de glucosa y galactosa en una proporción 1:1, este polisacárido es producido en mayor cantidad por *Lactobacillus kefiranofaciens* (Zajšek, Kolar, & Goršek, 2011).

El kefirán posee propiedades reológicas que permiten mantener las propiedades viscoelásticas e impedir la pérdida de agua, aumentando la viscosidad en productos a base de leche (Rimada & Abraham, 2006). El kefirán (glucolactano) se utiliza como aditivo (Wang, Ahmed, Feng, Li, & Song, 2008), (Wang, y otros, 2010); permite la formación de geles con propiedades viscoelásticas a temperaturas bajas, mejorando las propiedades viscoelásticas de geles fabricados a partir de leche ácida.

Prado et al. (2015) cita a Koiman (1968) en su publicación, afirma que en un primer estudio, la estructura del kefirán estaba compuesta por kefirán (polisacárido) y kefirose (pentasacárido). Posteriormente, la estructura del kefirán se analizó con cromatografía y espectroscopía infrarroja (Wang, Ahmed, Feng, Li, & Song, 2008); (Chen, y otros, 2015) y resonancia magnética nuclear (RMN; (Ghasemlou, y otros, 2012)), observando su estructura real, según la figura 1.

**Figura 1.**

*Estructura del kefirán*



Fuente: Prado et al. (2015)

Como ya se mencionó previamente, la leche natural presenta una microbiota ineficiente, incontrolable e impredecible y cuando recibe tratamiento térmico para su conservación, se destruye por completo algunos microbios benéficos que se le atribuye a la leche. Los *cultivos iniciadores* o iniciadores lácticos proporcionan peculiaridades para que la conservación, por el método de fermentación, sea controlada y predecible. (Starter Cultures, s.f.). Sandine (1979) define a los cultivos iniciadores como un conjunto de microorganismos que han sido aislados y seleccionados a partir de una fermentación natural, para inocular un alimento e iniciar su fermentación. Estos microorganismos deben contener el mayor número de células viables y acondicionarse rápidamente en la producción, así como deben estar libres de contaminantes. La pureza y la actividad del cultivo iniciador determinarán la calidad del proceso de fermentación del producto lácteo cultivado. (Suryanti Surono, 2011). Para Chamba et al. (1994) la transformación de lactosa en ácido láctico es la principal función que cumplen los iniciadores lácticos. También brindan otras propiedades como sabor y aroma, así mismo, se puede decir que permite producir alcohol y actúan como inhibidores de organismos indeseables (Artica, 2015).

Garriga (1994) señaló que se utiliza con frecuencia los cultivos iniciadores en las fermentaciones industriales, trayendo como consecuencia la aparición de nuevos productos en el mercado, tales como bioconservadores, cultivos protectores, iniciadores y probióticos, estos presentan nuevas técnicas de conservación frente a las tradicionales y proporcionan un efecto beneficioso para la salud, ejerciendo un aporte nutritivo (Tatiana Beldarraín\*, 2008) . Gonzales - Fernández y colaboradores (2006) comentan que utilizar cultivos estárter permiten disminuir el tiempo de fermentación, además poseen bajo contenido en nitratos y nitritos en los productos (Cabeza Herrera E. A., 2015).

Los cultivos iniciadores, pueden clasificarse según la temperatura en la que crezcan mejor, estas pueden ser cultivos mesófilos (25 °C – 30 °C) y cultivos termófilos (37 °C - 45 °C) tal como se indica en la tabla 4. Para Cogan y colaboradores (1996), se clasifican según la cualidad de cepas que se conozcan (Artica, 2015):

- Cultivo de cepa única, formado por una cepa de una determinada especie.
- Cultivo definido múltiple, formado por varias cepas conocidas de una especie determinada.
- Cultivo definido mixto, formado por varias cepas conocidas de distintas especies.
- Cultivo indefinido o artesano, formado por numerosas especies y cepas, total o parcialmente desconocidas.

Los cultivos DVS son un tipo de tecnología de cultivos arrancadores, que tuvo sus inicios en 1982 por Eurozyme, una empresa francesa; estos microorganismos de una o más cepas definidas, han sido concentrados individualmente y liofilizados a menos de 3 % de humedad, luego son mezclados y almacenados en bolsas de aluminio tratadas con nitrógeno. La desventaja más resaltante es el retraso de 30 – 60 minutos para completar la fermentación (Suryanti Surono, 2011).

**Tabla 4***Cultivos iniciadores primarios*

Mesófilas	Termófilo
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>Cremeris</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Lb. helveticus</i>
<i>Lactobacillus kéfir</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i>
<i>Leuconostoc</i> spp	<i>Bifidobacterium</i> spp.

Fuente: Ingrid Suryanti Surono (2011)

### 2.2.2 Bacterias ácido-lácticas BAL

Las bacterias ácido-lácticas son microorganismos que pertenecen al tipo *phylum Firmicutes*, las cuales comprenden 20 géneros entre ellos los *Lactococcus* y los *Lactobacillus* (Parra Huertas, 2010). Estas BAL (bacterias ácido-lácticas) transforman la lactosa en ácido láctico, modificando la estructura proteica de la leche y brindándole un sabor ligeramente acidulado (ArgenBio, s.f.). Las BAL pueden clasificarse según la cantidad de ácido láctico que produce en homofermentativas y heterofermentativas y según la temperatura de crecimiento en mesófilos y termófilos (Parra Huertas, 2010).

#### Bacterias homofermentativas y heterofermentativas

La producción de ácido láctico en las bacterias homofermentativas es catalizado por las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, obteniendo un 85 % de ácido láctico. Este grupo está compuesto por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Las bacterias heterofermentativas solo alcanzan a producir 50 % de ácido láctico. La reacción química se realiza por medio de las enzimas fosfocetolasa, utilizando las vías de la hexosa monofosfato o pentosas, produciendo también CO<sub>2</sub> y otros compuestos. Comprenden *Lactococcus*,

*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Parra Huertas, 2010, pág. 96).

#### Bacterias mesófilas y termófilas

Las bacterias mesófilas tienen una temperatura ideal de crecimiento que está entre 20-25 °C, utiliza entre el 1-2 % de cultivo iniciador, necesita un tiempo de incubación entre 18-20 h y alcanza una acidez final de 0,8 % de ácido láctico. Las bacterias termófilas crecen entre 40-45 °C, emplea entre el 2-3 % de cultivo iniciador, se incuban entre 2-4 h y finalmente alcanza una acidez de 0,9 % de ácido láctico. (Parra Huertas, 2010, pág. 96)

#### *Lactococcus lactis*

Para Forbes y colaboradores (2002) , el *Lactococcus lactis* es una bacteria que pertenece a los *Streptococcaceae*, se encuentra en la microbiota transitoria o microbiota residente del tracto gastrointestinal en el ser humano. Comelli y colaboradores (2002) comentan que se usa como probiótico para reestablecer la flora intestinal, ya que inhibe la proliferación y colonización de otros microorganismos patógenos (Vidal Rosell, Fernandez Ferrer, & Alfonso Sabatier, 2008). El *lactococcus lactis* comprende a *L. lactis subsp. Lactis*, *L. lactis subsp. Cremoris* y *diacetylactis* (Valbuena, y otros, 2008). Knittel (1965), explica que las tres especies están estrechamente relacionadas ya que poseen estructuras de ADN similares (Mullan, 2011). *L. lactis subsp. Lactis* se emplea en cultivos arrancadores de queso y es el responsable de conferirle sabor. Orla-Jense (1919) observa que a diferencia del *L. lactis subsp. Lactis*, *L. lactis subsp. Cremoris* forma cadenas más largas, requiere menor temperatura para su crecimiento y presenta menor poder fermentativo (Nomura, Kimoto, Someya , & Suzuki, 1999). El *Lactococcus lactis subsp. lactis* fermenta gran cantidad de ácido láctico, produciendo algunas bacteriocinas (substancias antibacterianas) como la nisina y la diplococcina entre las más resaltantes (Valbuena, y otros, 2008)

### *Lactobacillus kéfir*

*Lactobacillus kéfir* pertenece al grupo III de los *Lactobacillus* heterofermentativos obligatorios, clasificados por Artica (2015), Su hábitat son los granos de kéfir. Fermentan hexosas produciendo ácido láctico, ácido acético o etanol (si contiene levaduras) y CO<sub>2</sub> en relación 1:1:1.

#### 2.2.3 Fermentación láctica y alcohólica del kéfir

El kéfir es el resultado de una fermentación alcohólica y láctica cuando los granos naturales de kéfir entran en contacto con la leche. Las bacterias fermentan las proteínas y los glúcidos de la leche, convirtiéndolo en ácido láctico, mientras que las levaduras presentes en los granos fermentan los glúcidos, transformándolo en 1 % de alcohol y liberando CO<sub>2</sub> (Gálvez Viteri, Heras Solíz , & Romo Leroux, 2012). Esto hace al kéfir mucho más asimilable que la leche y que puedan tomarlo personas intolerantes a la lactosa.

Pasteur denominó a la fermentación “la vida sin aire”, ya que su objetivo es obtener energía en ausencia de oxígeno. Para Levenspiel y Conesa (2004), la fermentación natural es muy compleja ya que la mezcla entre alimentos y células reaccionan incesantemente. La glucólisis es la ruta metabólica de la glucosa, compuesta de diferentes reacciones químicas para conseguir energía, es decir, la glucosa con sus 6 átomos de carbono se oxida parcialmente, obteniéndose 2 moléculas de piruvato (átomos de carbono), se invierten 2 ATP, generando 4 ATP y liberando energía; todos estos mecanismos se llevan a cabo en el citosol, parte importante de la célula (Sadava, Heller, Orians, Purves, & Hillis, 2008). La glucosa es oxidada durante la fermentación láctica, producto de esta reacción se obtiene energía y ácido láctico como desecho (ecuación 2.1).

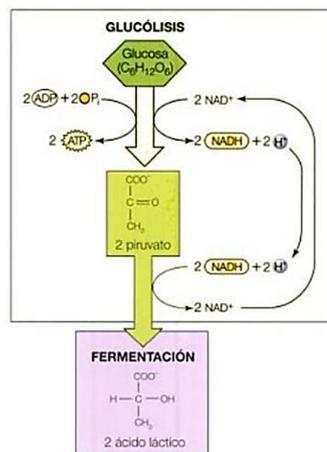


En el proceso de fermentación láctica una molécula de glucosa es oxidada y se producen 2 moléculas de ácido pirúvico por la acción del NAD, el NAD es

reducido a NADH<sub>2</sub>. En ausencia de suficiente oxígeno los productos de glucólisis (ácido pirúvico) se fermentan produciendo 2 moléculas de ácido láctico. En la figura 2 se esquematiza este proceso (Fernandez, 2008). La molécula de ácido láctico es la responsable del sabor ácido en quesos, yogures y kéfir, le brinda estabilidad y seguridad microbiológica en la conservación del alimento (Parra Huertas, 2010).

**Figura 2.**

*Fermentación láctica*



Fuente: Sadava y colaboradores (2008)

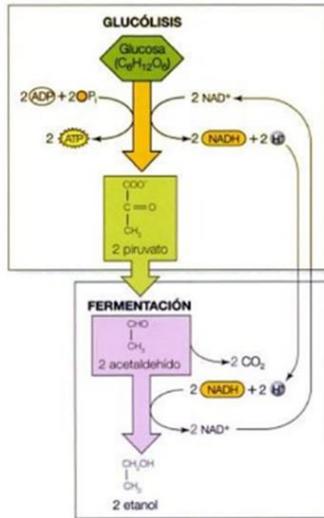
En la fermentación alcohólica, la glucosa produce acetaldehído y libera CO<sub>2</sub>; pero el NADH y el H<sup>+</sup> presente en la glucólisis reduce el acetaldehído y lo convierte en etanol, la ecuación química neta de la producción de etanol a partir de la glucosa se observa en la ecuación (2.2), así mismo, el proceso se esquematiza en la figura 3 (Fernandez, 2008).



Los procesos bioquímicos de los microorganismos pueden ser afectados o inhibidos por un exceso en la acidez, en este caso el carbonato de calcio se utiliza en la industria alimentaria para disminuir el exceso de acidez producto de la fermentación láctica. (Arévalo Ortiz & Quispe Cáceres, 2008).

**Figura 3.**

*Fermentación alcohólica*



Fuente: Sadava y colaboradores (2008)

#### 2.2.4 Cinética de crecimiento microbiano

Las reacciones químicas de nutrientes que ocurren en la célula se denominan metabolismo, ocurre en el citoplasma que comprende dos fases: anabolismo y catabolismo. Su objetivo es liberar energía para luego ser utilizada en el movimiento, crecimiento, respiración, reproducción y otras actividades que realiza la célula (Mayor & Mayor, 1994, pág. 54). El catabolismo o respiración celular, comprende a una reacción de oxidación con la materia orgánica, produciendo energía bioquímica y compuestos tóxicos como el CO<sub>2</sub> que la célula termina expulsando. En el anabolismo, las sustancias orgánicas básicas y la energía creada se utilizan en la síntesis de las macromoléculas orgánicas (Universidad Internacional de Valencia, 2018).

La relación entre anabolismo y catabolismo es el resultado del crecimiento microbiano. (Mayor & Mayor, 1994, pág. 54). Este crecimiento ocurre por la ley de conservación de materia y energía y se describe a través de un balance global de materia, el balance puede representarse mediante la ecuación (2.3) para organismos heterótrofos aerobios y en estado estacionario (Ramírez, 2006). El

crecimiento microbiano es el “incremento ordenado de todos los componentes químicos” para mantener controlado la producción del metabolito de interés. (Rodríguez Arévalo, 2003)

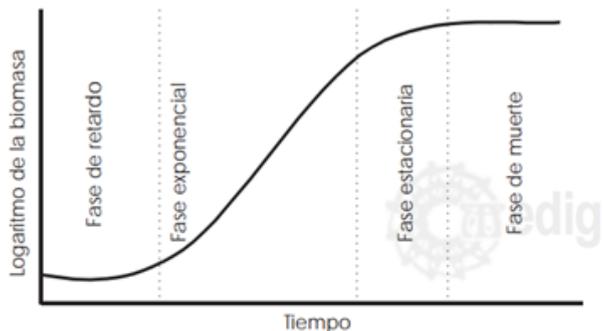


Los microorganismos contenidos en el cultivo desarrollan el crecimiento microbiano en un medio a lo largo de la fermentación, atraviesan cuatro fases: la fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. La figura 4 describe las fases del crecimiento microbiano (Rodríguez Arévalo, 2003).

La fase de latencia consiste en el acondicionamiento de la célula al sustrato, luego las células empiezan a crecer exponencialmente consumiendo el sustrato disponible hasta agotarse cesando el crecimiento e iniciándose la fase estacionaria; por último, se da la fase de muerte al agotarse las propiedades óptimas que permiten y mantienen viabilidad celular (Ramírez, 2006, pág. 16).

#### Figura 4.

*Curva de crecimiento de un cultivo*



Fuente: Rodríguez (2003)

Los métodos para medir el crecimiento de los microorganismos son: peso seco, absorbancia, número de células viables, contador de células, entre otras, donde el peso seco permite determinar de manera directa la biomasa (Rodríguez Arévalo, 2003). La tabla 5 muestra algunos modelos matemáticos que representan la cinética de crecimiento microbiano que acontecen en un

bioproceso. Estos modelos describen el comportamiento del bioproceso, es decir, sirven para diseñar sistemas y equipos, además de operar y controlar el proceso (Ramírez, 2006).

El modelo de Monod es uno de los modelos matemáticos más simple que se puede proponer para describir la velocidad de crecimiento. (Ramírez, 2006). Otros modelos primarios para describir la cinética de crecimiento generada por los microorganismos de interés bajo condiciones ambientales establecidas son: “*Gompertz* propuesta por Zwietering et al. (1990) y el modelo de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994)”. (Cayré, Vignolo, & Garro, 2007)

**Tabla 5**

*Modelos para describir cinéticas de crecimiento*

Nombre	Ecuación
Ecuación logística	$X = \frac{X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}}{1 - \frac{1}{X_m} X_0 \cdot (1 - e^{\mu \cdot t})}$
Cuando dos sustratos limitan simultáneamente	$\mu = \mu_m \cdot \left( \frac{S_1}{K_{S_1} + S_1} \right) \cdot \left( \frac{S_2}{K_{S_2} + S_2} \right)$
Modelo de Tessier	$\mu = \mu_m \cdot \left( 1 + e^{\frac{-S}{K_S}} \right)$
Modelo de Moser	$\mu = \mu_m \cdot (1 + K_S \cdot S^{-\lambda})^{-1}$
Modelo de Contois	$\mu = \mu_m \cdot \left( \frac{S}{B \cdot X + S} \right)$
Modelo de Poell	$\mu = \mu_m \cdot \left( \frac{K_S + L + S}{2L} \right) \cdot \left[ 1 - \frac{\sqrt{1 - 4L \cdot S}}{(K_S + L + S)^2} \right]$

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)

## Modelo de MONOD

El modelo de Monod es el más utilizado para describir la velocidad de crecimiento de un gran número de cultivos, por su simplicidad y por su generalidad. El modelo de Monod está representado por la ecuación (2.4) y describe una función hiperbólica en el que relaciona  $\mu$  y la concentración de sustrato limitante (Ramírez, 2006)

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot [S]}{k_s + [S]} \quad (2.4)$$

Dónde:

$\mu$ : velocidad microbiana

$\mu_{\max}$ : velocidad microbiana máxima

[S]: concentración del sustrato

$k_s$ : constante de Monod

## Modelo de BARANYI -ROBERTS

El modelo de Baranyi-Roberts,  $\mu(t)$  describe la cinética de crecimiento microbiano de orden uno en función del tiempo, depende de las condiciones ambientales y la fase en que se encuentre la población. En la fase exponencial este coeficiente alcanza  $\mu_{\max}$ , 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. La ecuación (2.5) describe el modelo propuesto por Baranyi y Roberts, el cual se ha convertido en uno de los modelos más utilizados para el modelamiento de crecimiento microbiano (Garre Pérez, Egea Larrosa, & Fernández Escaméz, 2016)

$$y(t) = y_{\max} + \ln \left[ \frac{-1 + e^{\mu_{\max} \cdot \lambda} + e^{\mu_{\max} \cdot t}}{-1 + e^{\mu_{\max} \cdot t} + e^{(\mu_{\max} \cdot \lambda + y_{\max} - y_0)}} \right] \quad (2.5)$$

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 ( $t$ )

### 2.2.5 Vida útil de los lácteos

Stiles (1996) define la bioconservación como la extensión de la vida útil y seguridad de un alimento utilizando microbiota natural o controlada y/o sus compuestos antimicrobianos, denominadas bacteriocinas. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un ejemplo de microbiota que más se ha utilizado como bioconservador, la bacteria *Lactococcus lactis* sintetiza de forma natural la nisina, el cual es un antibiótico peptídico policíclico (Romero Machado & Héctor Ardisana, 2016), siendo catalogada como producto seguro con nivel GRAS (“Generally Recognized As Safe”) y está autorizada por la FDA (“Food and Drug Administration”) para su aplicación en lácteos (Chen & Hoover, 2003). Algunos de los patógenos que surgen en los productos lácteos son: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Parente y Hill (1992) afirman que las bacteriocinas de *E. faecium* DPC1146 inhiben a *L. monocytogenes* en leche. Lauková y col. (1999) aseveran que la enterocina CCM 4231 reduce las cuentas viables de *S. aureus* SA1 en leche descremada y leche para formulas infantiles y yogurt. Otra bacteriocina de amplio espectro y de dos componentes es la lactacina 314, producida por *L. lactis* subsp. *Lactis* DPC 3147 (De la Fuente Salcido & Barboza Corona, 2010).

La vida útil o vida comercial es el tiempo finito que luego de haber sido fabricado y almacenado bajo condiciones estrictamente controladas, sus propiedades sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas empiezan a sufrir cambios (Carrillo Inungaray & Reyes Munguía, 2013), es decir es el tiempo máximo en que puede ser consumido el alimento. Depende directamente de factores ambientales

(temperatura, presión, humedad) y factores de composición (concentración, pH) (Espinoza Atencia, 1996). El sabor, la textura, la apariencia, la inocuidad la composición y la funcionalidad son características de calidad, en el momento en el que se considere inaceptable alguno de estos parámetros, puede afirmarse que el producto ha terminado su tiempo de vida útil. (Anzueto, 2012). Existen diversos métodos para determinar el tiempo de vida útil (Nuñez de Villavicencio, 2013).

## 2.2.6 Modelos matemáticos para estimar vida útil en lácteos

### Ecuación de Arrhenius

Los organismos vivos son sistemas abiertos y no se encuentran en equilibrio por lo que es más importante la velocidad de reacción química que la constante de equilibrio, Arrhenius marcó un significativo interés al relacionar la velocidad de reacción y la temperatura; es decir, al incrementar la temperatura aumenta el número de moléculas que contienen un exceso de energía sobre el promedio de todas las moléculas produciendo más colisiones entre moléculas con las condiciones determinadas para efectuarse la reacción. Así mismo, al relacionar la constante de equilibrio con la temperatura resulta la ecuación (2.6) (Pons Muzzo, 1985)

$$\frac{d(\ln K)}{dT} = \frac{E_a}{R \cdot T^2} \quad (2.6)$$

Si  $E_a$  es la energía de activación y se mantiene constante, integrando la ecuación (2.6) entre las temperaturas  $T_1$  y  $T_2$  con constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$ , resulta la ecuación (2.7) que se observa a continuación:

$$\log \left( \frac{k_2}{k_1} \right) = \frac{E_a}{2.30R} \left( \frac{T_1 - T_2}{T_1 \times T_2} \right) \quad (2.7)$$

Acomodando la expresión anterior queda como resultado la ecuación (2.8) en base decimal o la ecuación (2.9) en base exponencial.

$$\log(k) = \frac{-E_a}{2.30 \times R} \times \frac{1}{T} - \left( \frac{E_a}{2.30 \times R} \times \frac{1}{T_1} + (\log k_1) \right) \quad (2.8)$$

$$\ln(k) = \frac{-E_a}{R} \times \frac{1}{T} - \left( \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T_1} + (\ln k_1) \right) \quad (2.9)$$

La ecuación (2.10) muestra que la constante de velocidad depende de la temperatura. Donde, A y B son constantes que dependen de la reacción estudiada.

$$k = A \cdot e^{\frac{B}{T}} \quad (2.10)$$

“La ecuación de Arrhenius es empleada para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano, por consiguiente, k se transforma en la velocidad de crecimiento específico” (Ross & McMeekin, 1994); (Giannuzzi, Pinotti, & Zaritzky, 1998), en otras palabras, la ecuación anterior se convierte en la ecuación (2.11) y aplicando logaritmo natural, se convierte en la ecuación (2.12).

$$\mu = A e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (2.11)$$

$$\ln(\mu) = \frac{-E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln(A) \quad (2.12)$$

Dónde:

$\mu$ : Velocidad de crecimiento microbiano ( $días^{-1}$ ,  $hora^{-1}$ )

$E_a$  es la energía de activación ( $J mol^{-1}$ )

R: Constante universal de los gases (8,3143 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>)

A: Factor de frecuencia. Indica la frecuencia de las colisiones

T: temperatura absoluta (K)

Valor Q<sub>10</sub>

La temperatura es un factor importante que afecta directamente en la conservación del alimento (Espinoza Atencia, 1996) y se relaciona con la velocidad de crecimiento tal como se muestra en la ecuación (2.13). Entre diversos modelos cinético-matemáticos, se tiene el factor Q<sub>10</sub>, que relaciona la temperatura y la velocidad de deterioro.

$$[Q_{10}] = \frac{\text{Velocidad de reacción a } (T+10^{\circ}\text{C})}{\text{Velocidad de reacción a } T} \quad (2.13)$$

Dónde:

*k*: constante de velocidad

El valor Q<sub>10</sub> se obtiene a partir de la ecuación de Van't Hoff (Espinoza Atencia, 1996) como se muestra en la ecuación (2.14):

$$[Q_{10}]^{\frac{T_2-T_1}{10}} = \frac{ts_{T1}}{ts_{T2}} \quad (2.14)$$

Dónde:

ts<sub>T1</sub>=tiempo de vida útil a la temperatura T<sub>1</sub>(días, semana, meses)

ts<sub>T2</sub>=tiempo de vida útil a la temperatura T<sub>2</sub> (días, semana, meses)

Labuza y Riboh (1982) así como Palazón y col (2009) proponen la ecuación (2.15) para estimar la vida útil a diferentes temperaturas (Perez Flores, y otros, 2017), donde A y B son constantes a calcular.

$$\log(\theta) = A - B \cdot T \quad (2.15)$$

Dónde:

$\theta$ : Vida útil (días, semana, meses)

T: temperatura (°C)

Fundamento de Agar MRS

Tortora y colaboradores (2007), definen medio de cultivo como “material nutritivo preparado para el crecimiento de microorganismos en un laboratorio”. El Agar MRS se utiliza con frecuencia para investigaciones que desea enriquecer, cultivar y aislar cualquier tipo de especies de *Lactobacillus* (Monar, Dávalos, Zapata, Caviedes, & Ramirez Cardenas, 2014), inclusive los *Lactobacillus L. brevis* y *L. fermenti*, que son difícilmente cultivables. El polisorbato, acetato de magnesio y manganeso, así como una base nutritiva abundante y rica que contiene el agar MRS, son las sustancias especiales que permiten el crecimiento de *Lactobacillus*. Pero posee escasa selectividad por lo que pueden crecer también especies de *Pediococcus* y de *Leuconostoc*, y otros gérmenes acompañantes (Himedia, Technical Data Lactobacillus MRS Agar M641, 2018)

### 2.3 Conceptual

A continuación, se presentan constructos que surgieron a partir del planteamiento del problema de investigación. Estos constructos son medidos en base a los elementos que los describen.

Así, por ejemplo, los tipos de proceso y la clasificación de cepas son elementos que describen al *proceso homofermentativo*. El control del proceso, la temperatura, la acidez, el tiempo de fermentación y la concentración describen los *parámetros de control*. El *modelo matemático de la cinética de reacción* está en función de la velocidad de reacción. La viscosidad, pH y acidez describen los *parámetros fisicoquímicos*. Las *características organolépticas* son descritas mediante el análisis sensorial.

El proceso homofermentativo del kéfir reúne las bacterias homofermentativas y heterofermentativas, para una producción entre el 50% al 85 % de ácido láctico (Parra Huertas, 2010, pág. 96) separándolo de las levaduras y evitando la simbiosis. El *Lactococcus lactis* actúa como inhibidor de los microorganismos patógenos (Vidal Rosell, Fernandez Ferrer, & Alfonso Sabatier, 2008). El *Lactococcus lactis* comprende a *L. lactis* subsp. *Lactis*, *L. lactis* subsp. *Cremoris* y *diacetylactis* (Valbuena, y otros, 2008). El *Lactobacillus* kéfir es el responsable de la producción de ácido láctico en mayor cantidad a través de las hexosas, ya que se trata de una cepa homofermentativa, además es el que le da el sabor característico del kéfir.

Es de vital importancia conocer las complejas reacciones que se realizan en el alimento con procesamiento mínimo; de esta forma se realizará una adecuada combinación entre la cantidad e intensidad de factores de conservación para que la velocidad de deterioro sea lenta. (Carrillo Inungaray & Reyes Munguía, 2013). Dicho de este modo, el modelo matemático de la cinética de reacción define la velocidad de crecimiento, la cual es necesaria para determinar el tiempo de vida útil que posee el alimento.

Los parámetros fisicoquímicos que controlan el proceso son viscosidad, pH y acidez, los cuales determinan la calidad del producto, siempre y cuando estos parámetros estén dentro del intervalo que marca la norma vigente (Codex stan 243-2003, 2010) utilizando métodos normalizados para calcular su valor. Las características organolépticas se miden a través del análisis sensorial, es decir a través de la apariencia, olor, aroma, textura y sabor del alimento (García Ahued) las cuales determinan el tiempo de aceptación del evaluador.

## **2.4 Definición de términos básicos**

### **Biotecnología**

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

### Bacteriófagos

Son aquellos virus que infectan a las bacterias, haciendo uso de algunas o todas sus maquinarias biosintéticas.

### Caracterización

Es la acción que determina los atributos peculiares de algo, de modo que claramente se distinga de los demás.

### Cultivos Iniciadores

Son cultivos iniciales de inoculación directa a la tina (DVI) o set-to-vat (DVS) kéfir starter.

### Diáuxico

Es el comportamiento que presentan algunos crecimientos microbianos, en el que se da lugar a dos fases exponenciales separadas por una fase estacionaria corta.

### 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.

### Gránulos de kéfir

Es una aglomeración simbiótica que se agrupan en una matriz llamada kefirán.

### Inoculación

Se refiere a la incorporación de una sustancia en un organismo para proporcionar medios de defensa o inmunidad a dicho organismo.

### Kéfir

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

### Kefirán

Llamado también kefirano, es una matriz polisacárida.

### Liofilización

Consiste en separar el agua de una sustancia mediante congelación y posterior sublimación a presión reducida del hielo formado, para dar lugar a un material esponjoso que se disuelve posteriormente con facilidad.

### Parámetro

Es una variable a la que se le atribuye un valor cuantitativo o cualitativo.

### 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.

### Sinéresis

Se puede entender desde el punto de vista químico como la separación de las fases que se encuentran presentes en una suspensión o mezcla.

### 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.

### Vida de anaquel

Es un periodo en el cual, bajo parámetros definidos, el alimento mantiene su calidad en textura, sabor y valor nutricional.

### III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

#### 3.1 Hipótesis

##### 3.1.1 Hipótesis General

Si se establece un proceso homofermentativo con bacterias probióticas del kéfir entonces se prolongará su tiempo de vida útil.

##### 3.1.2 Hipótesis específicas

- a. La obtención del kéfir y la determinación de sus parámetros permitirán obtener un producto óptimo.
- b. Los fundamentos de la cinética de la reacción microbiana adecuada nos permitirán determinar el modelo matemático de la velocidad de crecimiento microbiana para la producción de kéfir.
- c. Los parámetros fisicoquímicos en la elaboración de kéfir con culturas iniciadoras permitirán caracterizar al kéfir comercial.

#### 3.2 Definición conceptual de variables

##### Figura 5.

*Definición conceptual de variables*

$x$  = Proceso Homofermentativo de kéfir con bacterias probióticas típicas para prolongar su tiempo de vida útil.

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

$x_1$  = Obtención del kefir y determinación de sus parámetros

$x_2$  = Modelo matemático de la cinética de reacción microbiana para la producción de kéfir.

$x_3$  = Parámetros fisicoquímicos.

### 3.2.1 Operacionalización de variables

**Tabla 6**

*Operacionalización de Variables*

	VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR	ÍNDICE	MÉTODO	TÉCNICA
VARIABLE DEPENDIENTE	x= Proceso Homofermentativo de kéfir con bacterias probióticas típicas para prolongar su tiempo de vida útil	Tiempo de vida útil	Días	d	Método de estabilidad	- Encuesta
					Método del Almacenamiento acelerado a diferentes temperaturas	- Análisis documental
VARIABLE INDEPENDIENTE	x <sub>1</sub> = Obtención del kéfir y determinación de sus parámetros	Temperatura	Grados centígrados	°C	M. E. Temperatura	
		Acidez	pH	pH	M. E. Acidez	- Análisis documental
		Tiempo de fermentación	horas	h	M. E. Viabilidad de cultivos lácticos liofilizado	
	x <sub>2</sub> = Modelo matemático de la cinética de reacción microbiana para la producción de kéfir.	Concentración	Porcentaje	%		
		Fases crecimiento de los microorganismos del kéfir.	Unidades Formadoras de Colonia por gramo	UFC/g	M. E. Viabilidad de cultivos lácticos liofilizado	- Observación Experimental
		Tiempo generacional	Porcentaje de acidez valorable	%w/w	M. E. Acidez	- Análisis documental
x <sub>3</sub> = Parámetros fisicoquímicos.	Acidez valorable	Porcentaje de acidez valorable	%w/w	M. E. Acidez	- Observación experimental	
	pH	Valor de pH	pH			
	Viscosidad	Centipoise	cp	M. E. Viscosidad		

## **IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

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

Los tipos de investigación que se realizan en el presente trabajo de tesis son:

- a. Por su finalidad es de tipo aplicada, sirve en la industria alimentaria.
- b. Por su diseño interpretativo es de tipo experimental porque requiere de técnicas y procedimientos para la elaboración y caracterización del producto.
- c. Por el énfasis en la naturaleza de los datos manejados es de tipo mixta debido a que se caracterizará parámetros.
- d. Por el nivel de estudios es de tipo comparativa pues busca establecer diferencias y semejanzas entre la producción artesanal e industrial.

El presente estudio se realizó en las inmediaciones de los laboratorios de microbiología, investigación y química de alimentos de la Universidad Nacional del Callao, Perú. El diseño de la presente investigación ha considerado cuatro momentos, los cuales se observan en la figura 6 y se describen a continuación:

#### *Determinar los parámetros de control para la obtención del kéfir*

De los procedimientos y técnicas utilizados en la presente tesis, se determinó los parámetros de control para la obtención de kéfir como se describe a continuación:

La leche fue caracterizada según el DS 007-2017- MINAGRI Capítulo III artículo 12 y artículo 13 (MINAGRI, 2017) , el cual establece las especificaciones y técnicas sanitarias para la leche UHT. El cultivo DVS fue inoculado en leche Laive UHT por 18 h a 32 °C (Lactina Ltd, 2018) . Una porción del cultivo activado fue inoculada nuevamente en una muestra de leche e incubado por un periodo de 10 h a 32 °C. El producto fue almacenado en un recipiente de vidrio de

capacidad 250 mL y llevado a refrigeración (4 °C) para su posterior análisis fisicoquímico, microbiológico y sensorial.

*Realizar el análisis microbiano para el kéfir*

Se realizó el análisis microbiano del kéfir para determinar la cinética de la reacción microbiana y la velocidad de crecimiento para la producción de kéfir. Para determinar la velocidad de crecimiento se requiere establecer las fases de latencia, logarítmica, tiempo generacional y fase estacionaria de los microorganismos del kéfir. En esta etapa se realizó el recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) por el método descrito por Monar et al. (2014, págs. B61-B62)

*Determinar los parámetros fisicoquímicos del kéfir*

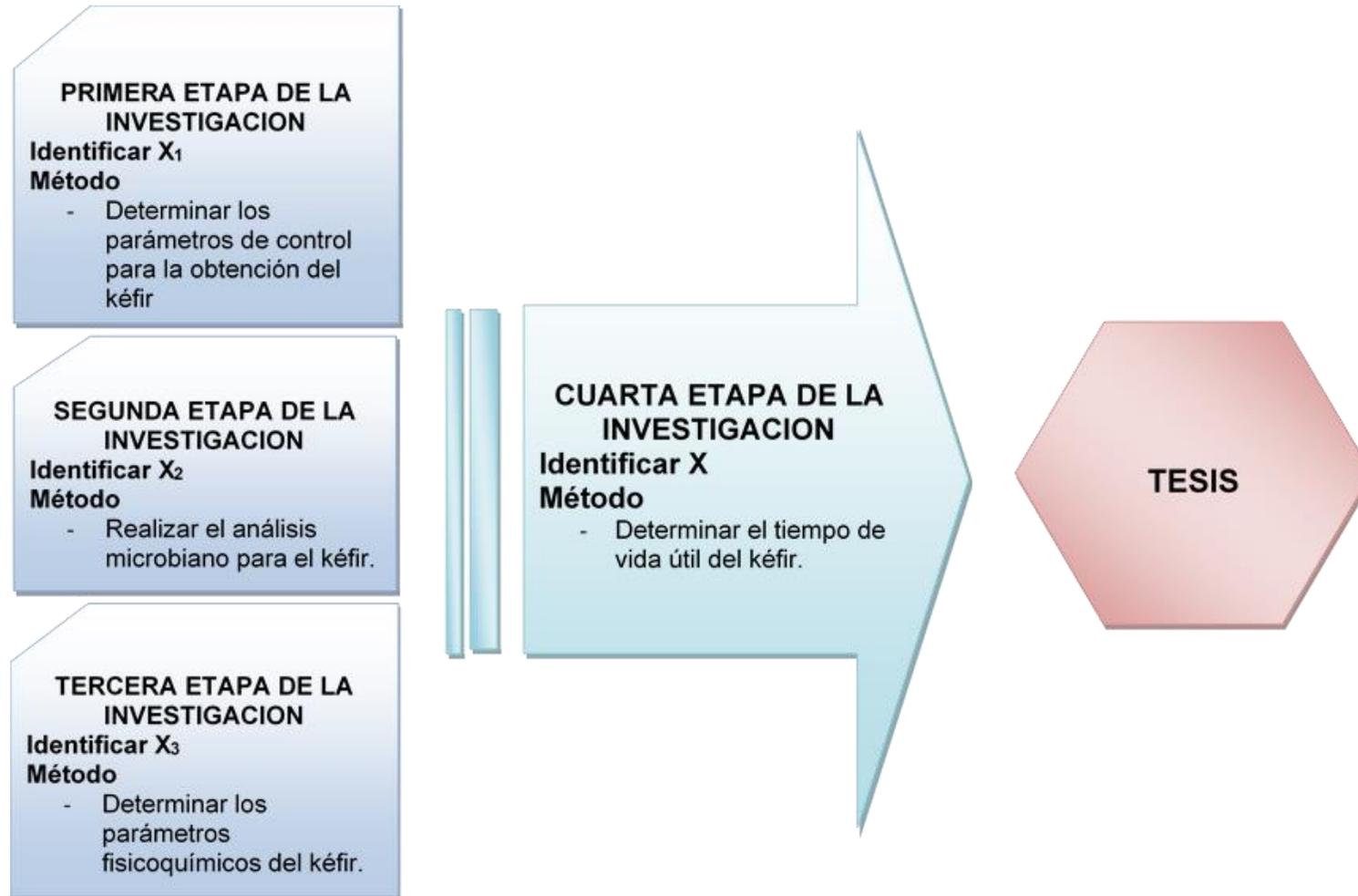
Se determinó los parámetros fisicoquímicos, a través de normas técnicas aplicadas a productos fermentados aplicando el método seguido por Monar et al. (2014, págs. B61-B62)

*Determinar el tiempo de vida útil del kéfir*

Relacionando las variables independientes que cumplan con las condiciones establecidas, aplicando el método de Arrhenius se determinó el tiempo de vida útil; finalmente, se comprobó que el proceso homofermentativo alarga la vida útil del producto.

**Figura 6.**

*Diseño de la Investigación*



## **4.2 Método de Investigación**

Los métodos utilizados en esta investigación fueron los siguientes:

### **4.2.1 Método de Ensayo Temperatura**

Se consideraron las siguientes pautas para la determinación de la temperatura en la muestra tal como se observa en la guía práctica para el control de calidad de la leche cruda (2003) y el código de normas alimentarias de Australia y Nueva Zelanda (2001).

Verificar la calibración y graduación de los termómetros de modo tal que cubran entre  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $+110\text{ }^{\circ}\text{C}$  aproximadamente, con divisiones de  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Insertar convenientemente el termómetro en la muestra y dejar por 10 segundos para que se establezca la temperatura del termómetro, en caso no se use un termómetro digital, debe retirarse y leer con celeridad.

Verificar la limpieza y libre de contaminación de los termómetros, después de usarlos, lavarlos con agua y detergente, luego desinfectarlo con una torula de algodón estéril y alcohol  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , esperar que se evapore y guardar en un lugar limpio.

### **4.2.2 Método de Ensayo Acidez**

Para la determinación del porcentaje de acidez de la muestra se considera lo siguiente:

Se prepara la solución de NaOH a  $0,1\text{ N}$  y se estandariza usando biftalato de potasio como estándar. La solución estandarizada se recarga en una bureta de  $50\text{ mL}$ .

Se utiliza una alícuota de 10 mL de muestra que se depositan en un matraz Erlenmeyer a los que se le adicionan 20 mL de agua destilada y 3 gotas de fenolftaleína y se valora con el NaOH estandarizado.

Para determinar el pH de la muestra se utilizó un potenciómetro marca HANNA modelo EDGE y se siguió las recomendaciones del manual (Hanna, 2015):  
Verificar la calibración del electrodo antes de tomar mediciones.

Enjuagar el sensor del pH con agua destilada y una alícuota de la muestra  
Sumergir la punta del electrodo aproximadamente 3 cm en la muestra a ser medida y agitar suavemente la muestra.

Permitir la estabilización del electrodo y tomar nota de la lectura de la pantalla del dispositivo.

Enjuagar el electrodo y depositarlo en la cubeta que contiene el buffer de calibración.

#### 4.2.3 Método de Ensayo Viabilidad de Cultivos lácticos liofilizado

El siguiente método se emplea para determinar la cantidad de células viables en la muestra (Centro Nacional de Inspección de la Calidad, 2008):

Destapar el cultivo a evaluar y extraer cuidadosamente con ayuda de una pipeta una alícuota de 1 mL en un tubo de ensayo que contiene 9 mL de agua peptonada muy próximo a la llama del mechero evitando el ingreso de aire contaminado.

Realizar diluciones en serie de acuerdo a conveniencia.

Se toma 1 mL de las últimas 3 diluciones y se añaden 15 mL del medio de cultivo MRS que fue previamente fundido a 115 °C y luego es enfriado hasta 43 °C (Himedia, 2018).

Realizar suavemente movimientos rotatorios en forma de ocho entre 5 a 10 s. Colocar las placas de Petri en reposo hasta su solidificación.

Incubar las placas a 30 °C por 72 h. Finalizado el tiempo, hacer el recuento de colonias de cada placa, empleando un contador de colonias.

Se escogen las placas cuyo número de colonias oscilan entre 15 y 300. Los resultados son reportados como número de unidades formadoras de colonia por mL de cultivo según NC/ISO 4833:02 en el acápite 10.1.1

#### 4.2.4 Método de Ensayo Viscosidad

La viscosidad se midió utilizando un viscosímetro VISCOSTAR Plus de la marca Fungilab S.A., equipo N°12 que se encuentra en el laboratorio de análisis químico IIEA (Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria) (Fungilab S.A.) . Para la determinación de la viscosidad se tomó las siguientes consideraciones:

Verificar la limpieza del husillo e insertarlo en tornillo de acoplamiento

Sumergir el huso en la muestra con ayuda de la perilla hasta el nivel que marca el husillo.

Programar los parámetros de medida y anotar el valor de la viscosidad

Apagar el equipo, retirar la muestra y limpiar el usillo con agua y detergente.

Desinfectar el huso con una torula de algodón estéril y alcohol 70 °C, esperar que se evapore y guardar en un lugar limpio.

### 4.3 Población y muestra

#### 4.3.1 Población

La población consiste en los diferentes tipos de kéfir existentes. En la actualidad existe numerosos productos basados en kéfir disponibles comercialmente como

el kéfir orgánico de leche entera, Helios kéfir, ProBugs kéfir, Frozen ProBugs (Organics), ProBugs Blast (Organics), (Prado, y otros, 2015)

#### 4.3.2 Muestra

La muestra no probabilística estuvo constituida al menos de 1L de kéfir elaborado con leche UHT inoculada con cultivos DVS para kéfir marca Lactina Ltd.

#### 4.4 Lugar de estudio y periodo de desarrollo

El presente estudio se realizó en las inmediaciones del laboratorio de microbiología, de la facultad de Matemática y Ciencias Naturales, así como en los laboratorios del Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria (IIEA) de la Universidad Nacional del Callao, Perú.

El periodo de desarrollo de la presente tesis estuvo comprendido entre febrero y diciembre del 2019

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

Se emplearon las técnicas e instrumentos siguientes para la recolección de la información:

##### 4.5.1 Diseño factorial.

Se empleó la técnica del diseño factorial para calcular el número de experimentos realizados en la presente investigación.

##### 4.5.2 Encuesta.

Se realizó mediante fichas: “Prueba de análisis sensorial sin escala hedónica” que se muestran en el apéndice N°1, para determinar el tiempo de aceptabilidad del kéfir

#### 4.5.3 Análisis Documental.

Se revisó fuentes bibliográficas para corroborar los parámetros de control del kéfir, así como el tiempo de vida útil de leches acidificadas.

#### 4.5.4 Observación experimental.

Esta técnica se utilizó para recoger los datos de parámetros fisicoquímicos

#### 4.5.5 Materia Prima

Para el desarrollo de la tesis se utilizó como materias primas: leche UHT marca Laive Light (55% menos grasa) conseguido en el mercado comercial del país, así como cultivos DVS starter liofilizados marca Lactina LTD procedente de Sofia en Bulgaria (Europa).

#### 4.5.6 Materiales, equipos e instrumentos

##### a. Equipos

Los equipos que se emplearon en la tesis se muestran en la tabla 7

**Tabla 7**

*Equipos de laboratorio*

NOMBRE	MARCA	Rango de operación
Estufa	Binder	100 °C – 120 °C
Incubadora	Binder	30 °C – 32 °C
Ph metro marca	Hanna	0 – 14 ± 0.02
Refrigeradora	SAMSUNG	4°C – 6°C
Autoclave	ENZO	0 – 30 psi
Balanza	PROFESSIONAL DIGITAL SCALE SF-400C	0 – 300 g ± 0.01 0 – 500 g ± 0.1

b. Reactivos y material de laboratorio

- Hidróxido de sodio (0,1 N)
- Biftalato de potasio
- Fenolftaleína
- Agua destilada
- Lejía
- Alcohol etílico (70 %)
- Agar MRS
- Agar EMB
- Agar Sabouraud
- Agua de peptona
- Vasos de precipitado
- Pipetas de 1 mL
- Fiola
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Bureta
- Probeta graduada
- Tubos de ensayo de 20 mL con tapa y gradilla
- Termómetro.
- Pizeta con agua destilada
- Placas Petri
- Frascos de vidrio autoclavables
- Jeringas de 1 mL
- Jeringas de 10 mL
- Jarras a medida (1 L)

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

Los *ensayos fisicoquímicos* realizados en la presente tesis se dieron en los apartados siguientes: cálculo del tiempo de activación, cálculo del volumen del cultivo madre estudio de la estabilidad del kéfir y estudio de almacenamiento

acelerado del kéfir a diferentes temperaturas. Estos fueron viscosidad, pH y % de acidéz.

Los *ensayos microbiológicos* se realizaron en los acápites: cálculo del tiempo de activación, cálculo del tiempo de incubación, estudio de la estabilidad del kéfir y estudio de almacenamiento acelerado del kéfir a diferentes temperaturas. Estos fueron la cantidad de células viables y presencia de microorganismos patógenos (coliformes, mohos y levaduras.)

En el estudio de estabilidad del kéfir se realizó el *ensayo sensorial*, evaluando apariencia, color, olor, sabor y textura.

#### 4.6.1 Ensayo para determinar el tiempo de activación de los cultivos DVS

Los cultivos DVS de la marca lactina-ltd fueron obtenidos de Bulgaria, en la tabla 8 se presentan las características obtenidas a partir de la ficha técnica (Lactina Ltd, 2018).

**Tabla 8**

*Datos extraídos de la ficha técnica de los cultivos starter*

Propiedad	Datos
Nombre del producto	Freeze-dried starters – DVS application for kefir
Composición	<i>Lactococcus cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lc. Diacetylactis</i> , <i>Lactobacillus kefir</i>
Materia seca	No menos del 94 %
Bacterias ácido lácticas CFU/g	> 5x10 <sup>9</sup>
Enterobacterias	Negative 1 g
Levaduras y mohos	Negative 1 g
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Negative 1 g
<i>Salmonella</i>	Negative 25 g

Un sobre que contenía 1 g de cultivo DVS fue inoculado en 1 L leche UHT Laive a una temperatura de 30°C (Suryanti Surono, 2011) y se varió el tiempo de incubación de 0 hasta 48 h obteniéndose el cultivo madre, tomando alícuotas de

1 mL cada 6 horas para el análisis microbiológico y 15 mL para el análisis fisicoquímico (Centro Nacional de Inspección de la Calidad, 2008). La figura 7 muestra el diagrama de flujo del proceso de activación del kéfir.

**Figura 7.**

*Diagrama de flujo del proceso en la etapa de activación del kéfir*



4.6.2 Análisis microbiológico en la etapa de activación

Las alícuotas extraídas de la muestra que se encuentra en etapa de activación fueron evaluadas mediante un análisis microbiológico, que consiste en el recuento de microorganismos presentes en el fermento. Alícuotas de 1 mL fueron adicionadas en tubos de ensayo con 9 mL de agua peptonada, luego se realizó diluciones en serie. Se toma 1 mL de las últimas 3 diluciones y se añaden 15 mL del medio de cultivo MRS que fue previamente fundido a 115 °C y luego es enfriado hasta 43 °C (Himedia, 2018). La mezcla se realiza suavemente mediante movimientos en forma de ocho durante un periodo de 5 a 10 s. Las placas de Petri fueron colocadas en reposo hasta su solidificación, posteriormente fueron incubadas a 30 °C por 72 h. Al finalizar la etapa de incubación se hizo un recuento de colonias de cada placa, empleando un contador de colonias. Se escogen las placas cuyo número de colonias oscilan entre 15 y 300. Los resultados son reportados como número de unidades

formadoras de colonia por mL de cultivo según NC/ISO 4833:02 en el acápite 10.1.1 (Centro Nacional de Inspección de la Calidad, 2008)

Para en análisis microbiológico de la presencia de mohos y levaduras se realizó el procedimiento descrito en el párrafo anterior, utilizando el medio agar Sabouraud (Condalab, 2019) y para el análisis de la presencia de coliformes se utilizó el agar EMB (Himedia, 2011).

#### 4.6.3 Análisis fisicoquímico en la etapa de activación

El análisis consistió en medir el pH, el porcentaje de acidez de la leche en proceso de fermentación y la viscosidad. El pH se midió con un potenciómetro Hanna Edge, el cual contaba con electrodo de penetración y termómetro, éste se encontraba en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática.

Para la determinación del porcentaje de acidez de la leche fermentada, se procede a la estandarización del NaOH usando biftalato de potasio como estándar. Luego, a una alícuota de 10 mL de la leche fermentada se le adicionaron 20 mL de agua destilada y 3 gotas de fenolftaleína en un matraz Erlenmeyer, se valoró con el NaOH estandarizado.

La viscosidad se midió utilizando un viscosímetro VISCOSTAR Plus de la marca Fungilab S.A., equipo N°12 que se encuentra en el laboratorio de análisis químico IIEA (Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria) (Fungilab S.A.) .

#### 4.6.4 Determinación del volumen del cultivo madre en la etapa de incubación

Se determinó el volumen apropiado del cultivo Madre para la producción de kéfir en la etapa de incubación para lo cual se inoculó 30, 50 y 100 mL del cultivo madre en 1 L de leche UHT LAIVE a 30 °C y se determinó el porcentaje de acidez

de la leche, tal como lo indica el método de ensayo para la acidez. La tabla 9 muestra los datos de operación que debe tener en cuenta para este ensayo

**Tabla 9**

*Parámetros de operación para hallar volumen del cultivo madre*

Parámetro de operación	Valor
Volumen de cultivo madre (mL)	Variable
Volumen de leche UHT (mL)	1000
Temperatura de operación (°C)	30
Tiempo de mezclado (h)	12

#### 4.6.5 Ensayo para determinar el tiempo óptimo de incubación

Luego de establecer el volumen del cultivo madre, se calculó el tiempo para la producción del kéfir midiéndose las propiedades microbiológicas descritas anteriormente hasta alcanzar un valor  $10^7$  UFC / mL según la norma del CODEX para leches fermentadas (Codex stan 243-2003, 2010) . Se obtiene como producto de la fermentación el kéfir. El diagrama del proceso desarrollado se observa en figura 8. Las muestras fueron almacenadas en recipientes de vidrio de 250 mL, previamente esterilizados mediante autoclave. La tabla 10 muestra los parámetros de operación que debe tener en cuenta en este ensayo.

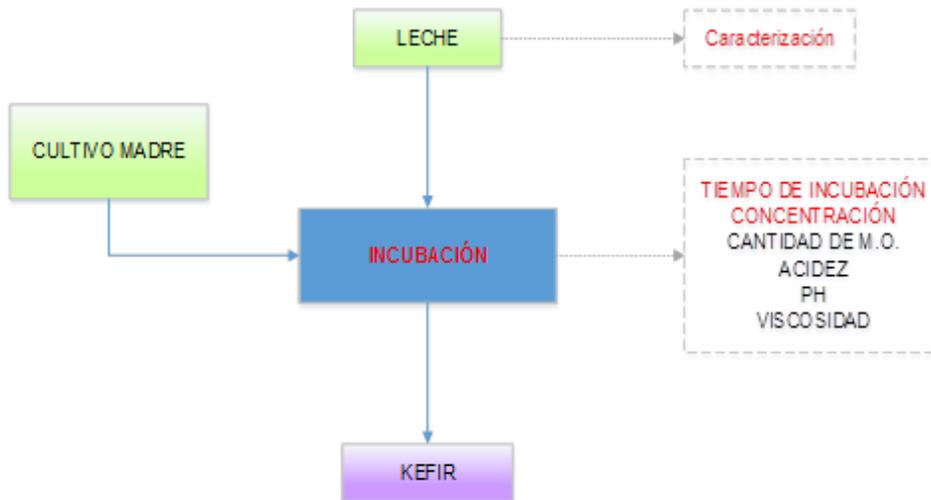
**Tabla 10**

*Parámetros de operación para tiempo óptimo de incubación*

Parámetro de operación	Valor
Volumen de cultivo madre (mL)	Fijo
Volumen de leche UHT (mL)	1000
Temperatura de operación (°C)	30
Tiempo de mezclado (h)	12

### Figura 8.

Diagrama de flujo del proceso en la etapa de incubación del kéfir



#### 4.6.6 Cálculo del tiempo de vida útil del kéfir

El tiempo de vida útil del kéfir se obtuvo a partir de 2 métodos: Estudio de estabilidad y estudio de almacenamiento acelerado del kéfir a diferentes temperaturas; los cuales se describen a continuación:

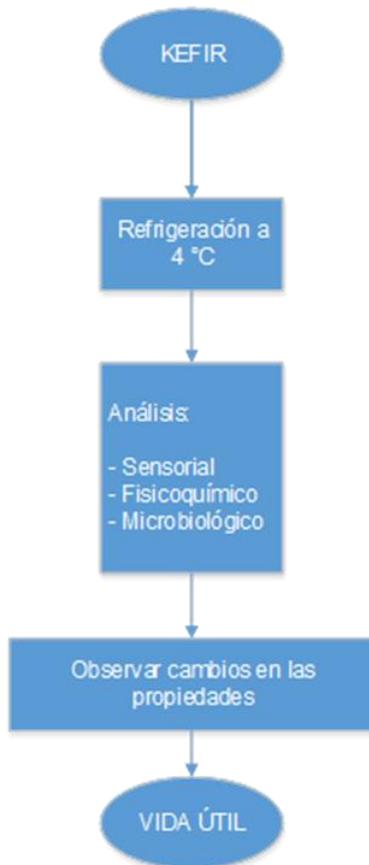
##### *Estudio de estabilidad del kéfir*

En este estudio se determinó el tiempo de fallo del kéfir al caracterizarlo por 36 días, analizando propiedades microbiológicas, propiedades fisicoquímicas y análisis sensorial. (Nuñez de Villavicencio, 2013)

Para el análisis sensorial durante el almacenamiento del kéfir a 4 °C, se trabajó con 35 personas no entrenadas a las que se les denominó “consumidores”. Cada día de análisis las muestras fueron retiradas del refrigerador y se evaluaron sensorialmente mediante pruebas de aceptación sin escala hedónica o afectiva (ver figura 9).

**Figura 9.**

*Diagrama de bloques para determinar el tiempo de vida útil por el método de estabilidad*

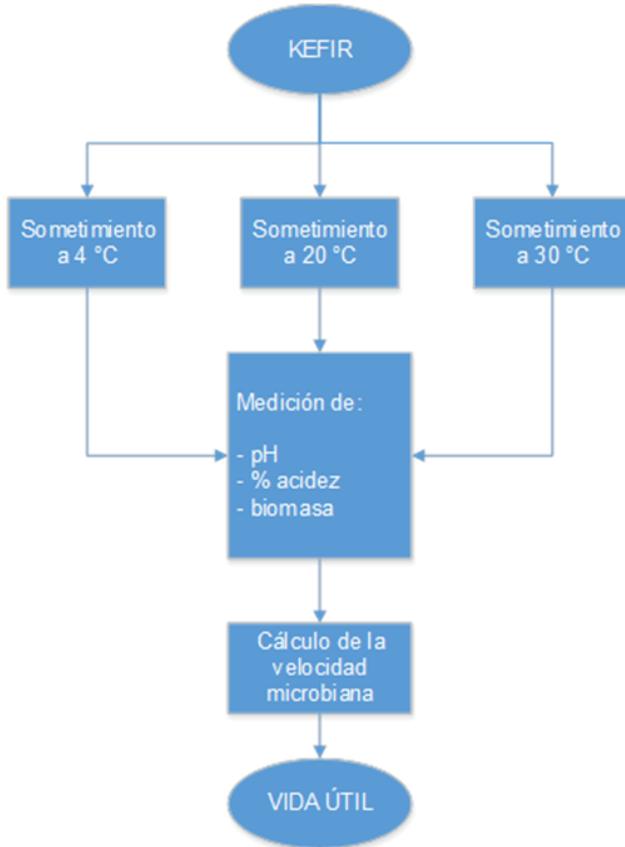


*Estudio de almacenamiento acelerado del kéfir a diferentes temperaturas*

El kéfir fue sometido a 3 temperaturas (4, 20 y 30 °C), de las muestras tratadas a diferentes temperaturas se extrajeron 7 alícuotas a diferentes intervalos de tiempo (0, 3, 15, 21, 24, 39 y 45 h) y se realizó el análisis microbiológico y físicoquímico (acidez, pH, biomasa) (Nuñez de Villavicencio, 2013). Para este estudio, se determinó primero la velocidad del crecimiento microbiano mediante el modelo de Baranyi-Roberts y el modelo clásico, seguidamente se calculó el tiempo de vida útil en condiciones normales de almacenamiento, los pasos a seguir se detallan en la figura 10.

**Figura 10.**

*Diagrama de bloques para determinar el tiempo de vida útil por el método de almacenamiento acelerado*



#### 4.6.7 Ajuste de la curva de crecimiento con el modelo Baranyi-Roberts

Se realizó el ajuste de la curva de crecimiento con el modelo de Baranyi, calculado con el software Combase (Combase, 2019), brindando como resultado la velocidad de crecimiento máxima (Cabeza Herrera E. , 2018).

#### 4.6.8 Cálculo de la velocidad de crecimiento por el método clásico

La velocidad de crecimiento se define (Iañez Pareja, 1998) mediante la siguiente ecuación

$$\mu = \frac{\ln(N) - \ln(N_0)}{t - t_0} \quad (4.1)$$

Dónde:

$\mu$ : Velocidad de crecimiento microbiano ( $días^{-1}$ ,  $hora^{-1}$ )

$N_0$ : densidad bacteriana ( $UFC\ g^{-1}$ ) en el tiempo  $t_0$

$N$ : densidad bacteriana ( $UFC\ g^{-1}$ ) en el tiempo  $t$

## V. RESULTADOS

### 5.1 Resultados descriptivos

#### 5.1.1 Etapa de activación

En la tabla 11 se muestran los resultados de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos durante la activación del cultivo DVS de kéfir en la leche UHT Laive

**Tabla 11**

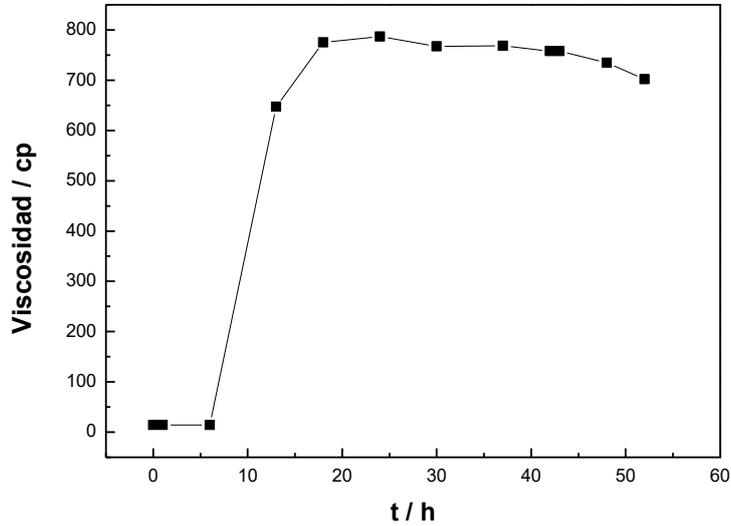
*Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en la activación*

Tiempo (h)	Acidez %	pH	Biomasa (UFC/mL)	LOG (UFC/mL)	Viscosidad (cp)	Fondo de escala 100 rpm R3 [0-1000] cp
0	0,11	7	$9,50 \times 10^2$	2,978	14,30	1,43 %
1	0,12	7	$3,32 \times 10^3$	3,521	14,30	1,43 %
6	0,12	6,9	$1,05 \times 10^5$	5,021	14,30	1,43 %
13	0,65	4,7	$7,91 \times 10^7$	7,898	647,00	64,70 %
18	0,75	4,6	$5,13 \times 10^8$	8,710	775,20	77,52 %
24	0,8	4,6	$3,37 \times 10^9$	9,528	786,80	78,68 %
30	0,82	4,6	$2,71 \times 10^{11}$	11,433	767,40	76,74 %
37	0,82	4,5	$3,50 \times 10^{14}$	14,544	768,40	76,84 %
42	0,89	4,5	$1,21 \times 10^{15}$	15,081	757,80	75,78 %
43	0,89	4,5	$4,16 \times 10^{15}$	15,619	758,10	75,81 %
48	0,89	4,5	$6,61 \times 10^{15}$	15,820	734,80	73,48 %

La evolución de la viscosidad del kéfir en la etapa de activación, a lo largo del tiempo se observa en la figura 11

**Figura 11.**

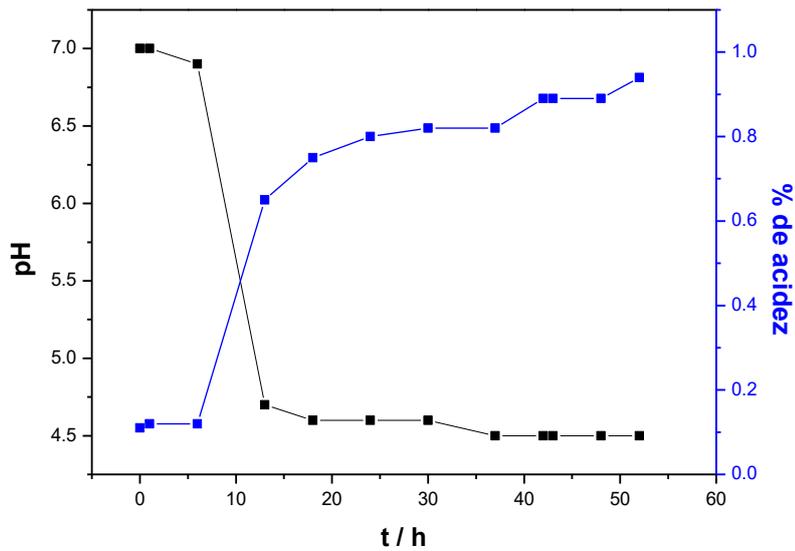
*Evolución de la viscosidad en la etapa de activación*



La figura 12 muestra la variación del pH y el % de acidez y en la figura 13 se puede observar el crecimiento microbiano durante la etapa de activación

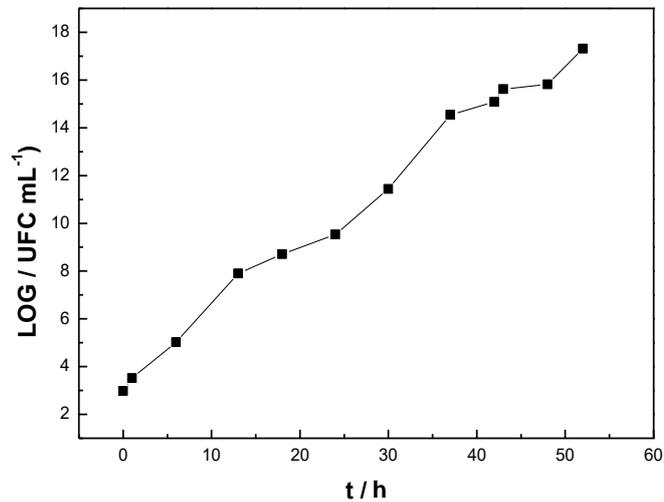
**Figura 12.**

*Variación del pH y % de acidez en la etapa de activación*



**Figura 13.**

*Crecimiento microbiano en la etapa de activación*



#### 5.1.2 Modelamiento de la curva de crecimiento en la etapa de activación

Se ajustaron los datos del Log (UFC/mL), presentes en la tabla 11, al modelo Baranyi-Roberts con el programa “COMBASE” ajustando la curva hasta 48 h de producción (Ver figura 14). Los parámetros del modelamiento se observan en la tabla 12.

**Tabla 12**

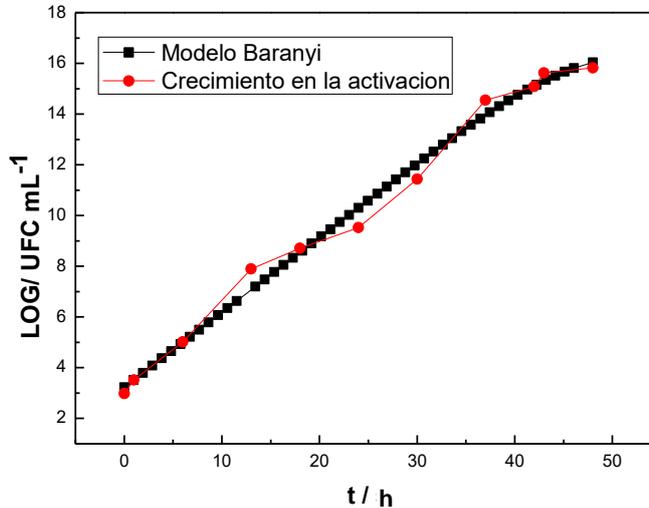
*Parámetros del modelamiento en la etapa de activación*

Parámetro	Valor
Tiempo de latencia	3,235 ± 0,305
Velocidad máxima de crecimiento	0,295 ± 0,0154
Tiempo final de crecimiento exponencial	18,651 ± 0,974

Adaptado del programa “Combase” (Universidad de Tasmania, 2019)

**Figura 14.**

*Curva de crecimiento modelada en etapa de activación*



### 5.1.3 Etapa de incubación

En la etapa de incubación primero se determinó el volumen óptimo del cultivo madre. La tabla 13 muestra los % de Acidez que se obtuvieron al ensayar con diferentes volúmenes del cultivo madre; cuando se empleó 30 mL de cultivo madre por litro de leche nueva, el tiempo de incubación se alcanza a las 10 h. Así mismo, al emplear 50 mL de cultivo madre por litro de leche nueva, el tiempo de incubación fue de 8 horas. Y al utilizar 100 mL de cultivo madre por litro de leche nueva, el tiempo de incubación resultó mayor a 5 horas. La figura 15 esboza la variación de la acidez según el volumen del cultivo madre durante la etapa de incubación.

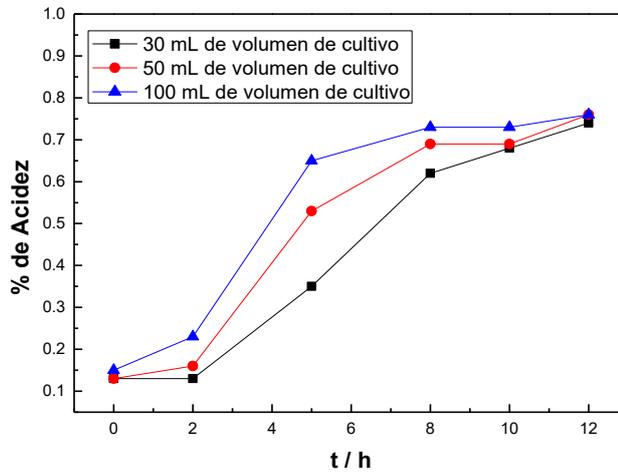
**Tabla 13**

*Variación del % acidez según volumen del cultivo madre*

TIEMPO (h)	% ACIDEZ con 30 mL	% ACIDEZ con 50 mL	% ACIDEZ con 100 mL
0	0,13	0,13	0,15
2	0,13	0,16	0,23
5	0,35	0,53	0,65
8	0,62	0,69	0,73
10	0,68	0,69	0,73
12	0,74	0,76	0,76

**Figura 15.**

*Variación del % acidez según volumen del cultivo madre*



La tabla 14 muestra los costos por litro de kéfir para los diferentes volúmenes de ensayo, obteniéndose para 30 mL/L de cultivo madre el costo más bajo, razón por la cual se escoge a esta cantidad como volumen óptimo del cultivo madre.

**Tabla 14**

*Costo por litro de kéfir*

Insumo	Volumen de cultivo madre		
	30 mL/L	50 mL/L	100 mL/L
Leche (S/.)	4,5	4,5	4,5
Cultivo madre (S/.)	0,33	0,55	1,1
Energía (S/.) (S/. 2,00 por 24 H)	0,83	0,67	0,5
Total (S/. /L)	5,66	5,72	6,10

Habiéndose determinado el volumen del cultivo madre se calculó el tiempo de incubación, fabricando nuevamente kéfir y empleando el volumen de cultivo madre resultante. La tabla 15 expone los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos determinados en la etapa de incubación. La representación gráfica de la viscosidad versus el número de horas se observa en la figura 16 y en la figura 17 se observa la variación de pH y % de acidez en el tiempo. La figura 18 muestra el crecimiento microbiano durante la etapa de incubación.

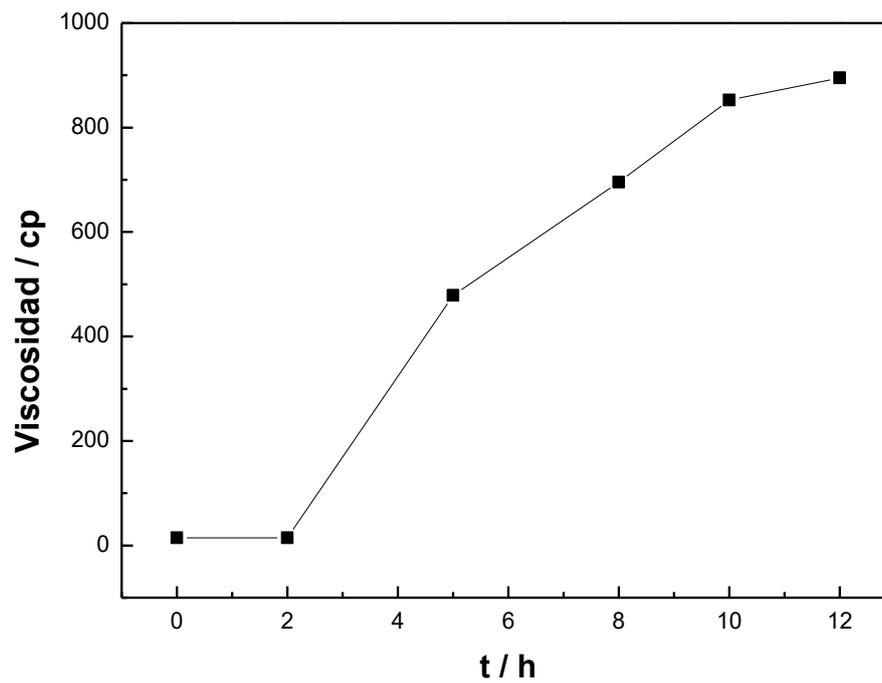
**Tabla 15**

*Parámetros fisicoquímicos 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

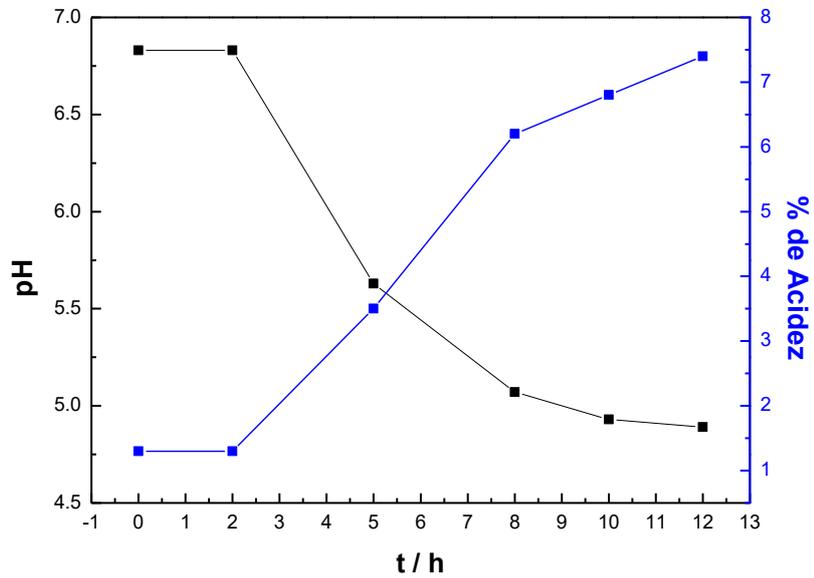
**Figura 16.**

*Viscosidad versus tiempo en la etapa de incubación*



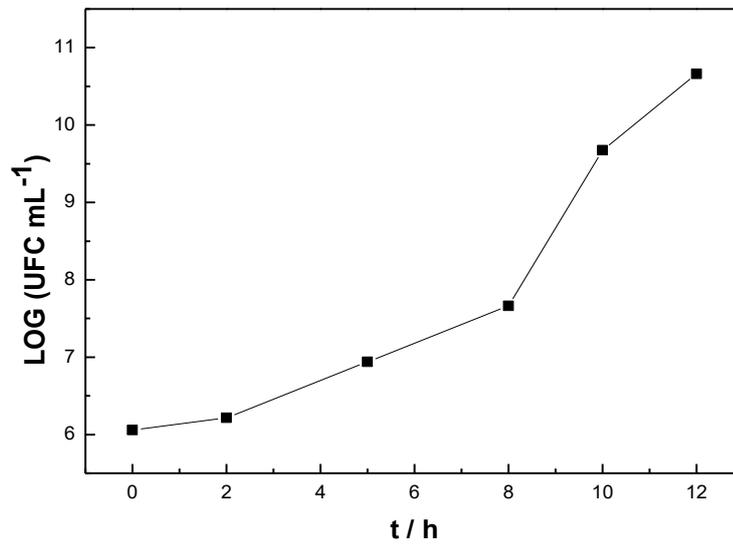
**Figura 17.**

*Variación del pH y % de acidez en la etapa de incubación*



**Figura 18.**

*Crecimiento microbiano en la etapa de incubación*

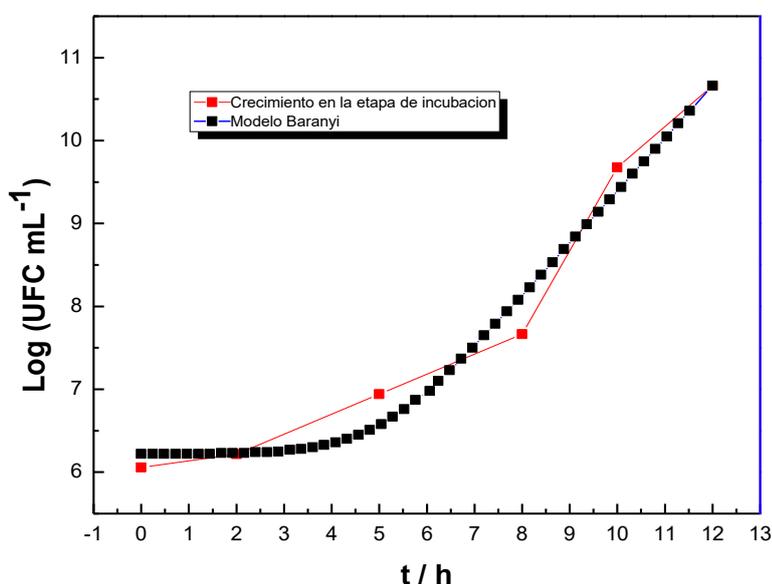


#### 5.1.4 Modelamiento de la curva de crecimiento en la etapa de incubación

Así como en la etapa de activación, se ajustaron los datos de la biomasa (Log (UFC/mL)), que se observan en la tabla 15, al modelo Baranyi-Roberts, tomando como soporte el programa “COMBASE”. La figura 19 muestra el modelamiento de la curva de crecimiento en la etapa de incubación y en la tabla 16 se aprecia los parámetros de este modelamiento.

**Figura 19.**

*Curva de crecimiento modelada en etapa de incubación*



**Tabla 16**

*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)

### 5.1.5 Estudio de la Estabilidad

La tabla 17 muestra los datos de los parámetros fisicoquímicos realizados en el estudio a las muestras de kéfir durante 36 días a 4°C. En la figura 20 se observa la variación de la viscosidad con el tiempo, de la misma manera, la figura 21 muestra el % de acidez y pH versus el tiempo. De este análisis se determinó que el producto tiene una duración de 30 días.

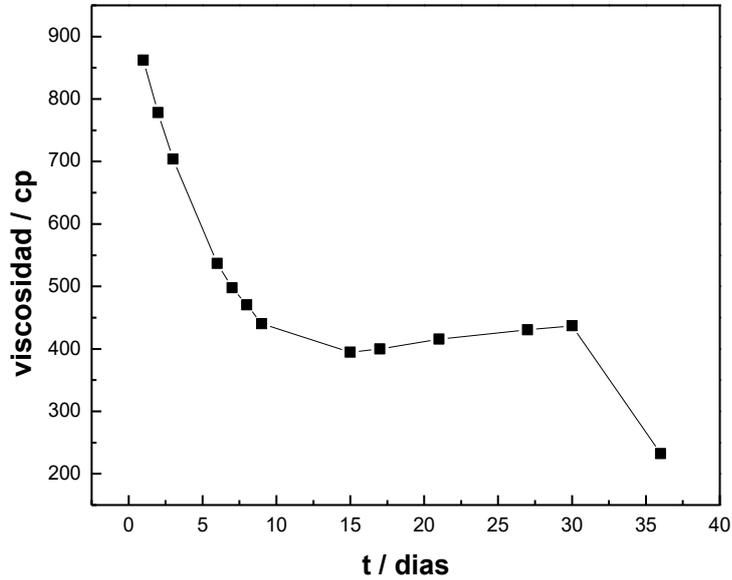
**Tabla 17**

*Parámetros fisicoquímicos en el estudio de la estabilidad*

N°	Día	Viscosidad cp	% Fondo de escala	Acidez %	pH
1	1	862,3	86,2	0,64	4,89
2	2	778,1	77,8	0,82	4,82
3	3	704,0	70,4	0,81	4,82
4	6	536,7	53,7	0,83	4,74
5	7	497,6	49,8	0,85	4,74
6	8	470,2	47,0	0,86	4,72
7	9	440,2	44,0	0,86	4,71
8	15	394,8	39,5	0,86	4,7
9	17	399,8	40,0	0,9	4,7
10	21	415,5	41,5	0,9	4,7
11	27	430,4	43,0	0,9	4,7
12	30	436,8	43,7	0,91	4,7
13	36	232,2	23,2	0,9	4,7

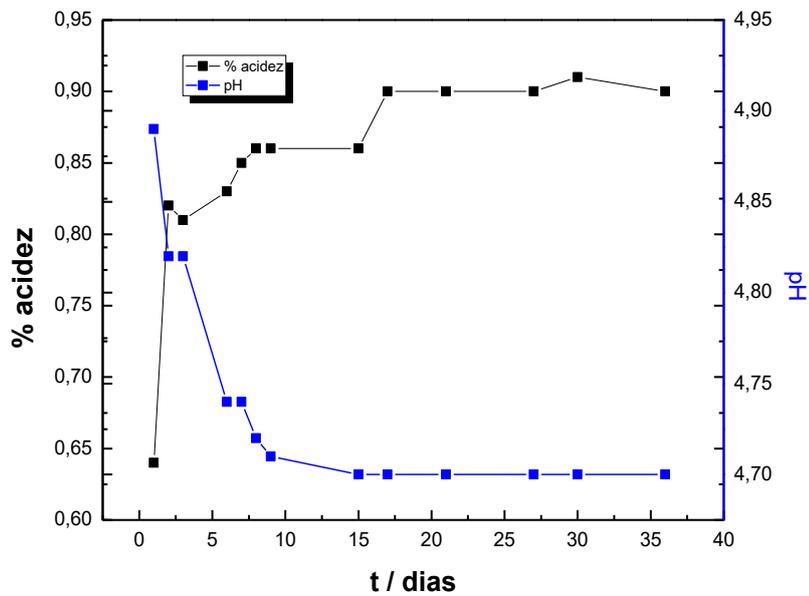
**Figura 20.**

*Viscosidad versus tiempo en el estudio de la estabilidad*



**Figura 21.**

*Variación del pH y % de acidez en el estudio de la estabilidad*



La tabla 18 muestra los datos microbiológicos y en la figura 22 se grafica la *el crecimiento microbiano durante el estudio de la estabilidad* expresada en Log UFC/ mL versus el tiempo.

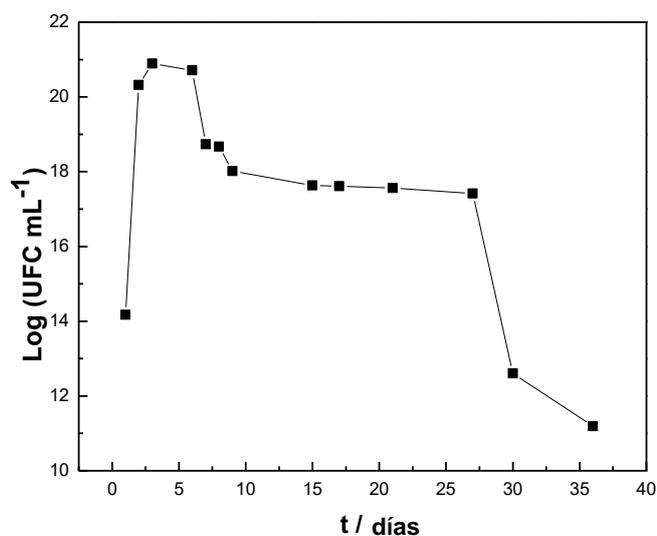
**Tabla 18**

*Parámetros microbiológicos en el estudio de la estabilidad*

N°	Día	Coliformes	Mohos y levaduras	Biomasa UFC/ml	Log (log UFC/ml)
1	1	0	1,10X10	1,49E+14	14,174016
2	2	0	1,10X10	2,11E+20	20,3251215
3	3	0	1,20X10	7,79E+20	20,8916510
4	6	0	1,20 X10	5,12E+22	22,7096156
5	7	0	1,10 X10	2,16E+18	18,3344868
6	8	0	1,20 X10	9,34E+16	16,9702147
7	9	0	1,20X10	1,04E+18	18,0177531
8	15	0	1,10 X10	4,33E+17	17,6361576
9	17	0	1,20 X10	4,10E+17	17,6128814
10	21	0	1,10 X10	3,67E+17	17,5646101
11	27	0	1,20 X10	2,62E+17	17,4175688
12	30	0	1,20 X10	4,05E+12	12,6078841
13	36	0	1,10 X10	1,54E+11	11,1877142

**Figura 22.**

*Crecimiento microbiano en el estudio de la estabilidad*



En este contexto, se determina que tiene una etapa estacionaria de microorganismos de hasta 27 días, alcanzando una población de  $2,62 \times 10^{17}$  UFC/mL.

El criterio de aceptación del producto se establece de acuerdo al rango calculado, cuando está entre 51% - 100% es aceptable, pero si es inferior recibe la calificación de no aceptable. La tabla 19 muestra el análisis sensorial que se realizó paralelamente a los cálculos fisicoquímicos y microbiológicos, en los días estudiados. En la figura 23 se grafica la influencia que tienen los parámetros del análisis sensorial sobre los consumidores, en esta figura se puede afirmar que los parámetros sabor y textura, son los más estimados por el consumidor a la hora de evaluar sensorialmente el kéfir.

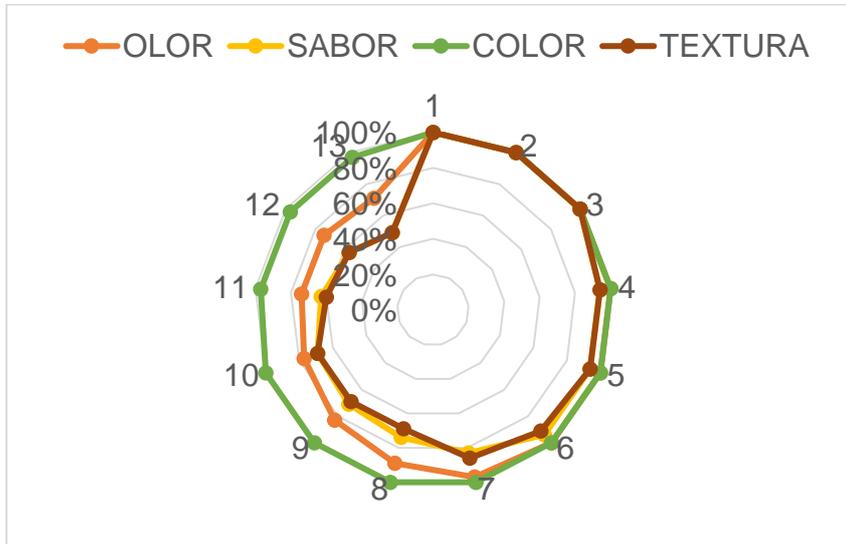
**Tabla 19**

*Análisis sensorial en el estudio de la estabilidad*

N°	Dia	Aceptación (%)				
		Olor	Sabor	Color	Textura	Aceptabilidad
1	1	100%	100%	100%	100%	100%
2	2	100%	100%	100%	100%	100%
3	3	100%	100%	100%	100%	100%
4	6	100%	94%	100%	94%	97%
5	7	100%	94%	100%	94%	97%
6	8	100%	94%	100%	91%	94%
7	9	97%	83%	100%	86%	91%
8	15	89%	74%	100%	69%	86%
9	17	83%	71%	100%	69%	74%
10	21	77%	69%	100%	69%	69%
11	27	74%	63%	97%	60%	60%
12	30	74%	57%	97%	57%	57%
13	36	71%	49%	97%	49%	49%

**Figura 23.**

*Influencia de los parámetros del análisis sensorial sobre los consumidores.*



#### 5.1.6 Estudio del Almacenamiento Acelerado

Las muestras de kéfir se sometieron a 3 temperaturas, se midieron las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del producto, los resultados del % de acidez versus el tiempo medidos a tres temperaturas se muestran en la tabla 20, y su gráfica se observa en la figura 24; de igual modo, la data de variación del pH a diferentes temperaturas se aprecia en la tabla 21 y su gráfica en la figura 25. La tabla 22 muestra los resultados de la variación de la biomasa y el tiempo y el gráfico de crecimiento microbiano para diferentes temperaturas, se observa en la figura 26

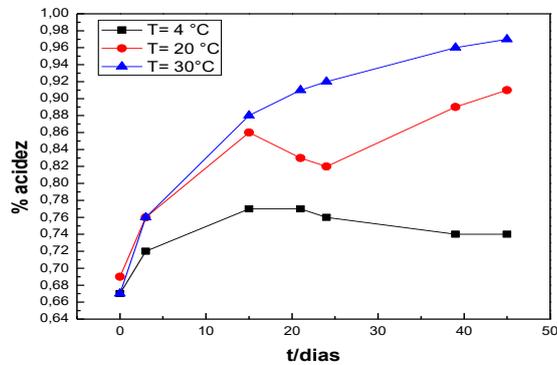
**Tabla 20**

*Porcentaje acidez a diferentes temperaturas de almacenamiento*

N°	Tiempo (horas)	% Acidez		
		T= 4 °C	T= 20 °C	T= 30 °C
1	0	0,67	0,69	0,67
2	3	0,72	0,76	0,76
3	15	0,77	0,86	0,88
4	21	0,77	0,83	0,91
5	24	0,76	0,82	0,92
6	39	0,74	0,89	0,96
7	45	0,74	0,91	0,97

**Figura 24.**

*Porcentaje acidez versus tiempo a diferentes temperaturas de almacenamiento*



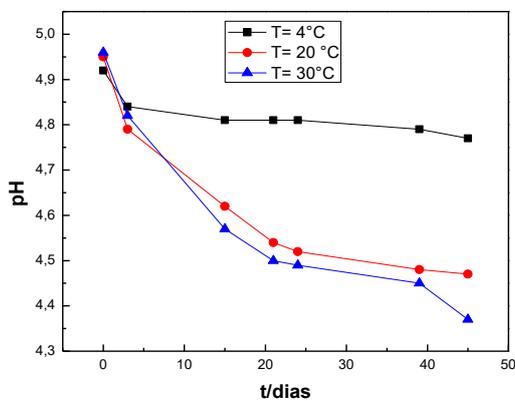
**Tabla 21**

*Variación del pH a diferentes temperaturas de almacenamiento*

N°	Tiempo (horas)	pH		
		T= 4 °C	T= 20 °C	T= 30 °C
1	0	4,92	4,95	4,96
2	3	4,84	4,79	4,82
3	15	4,81	4,62	4,57
4	21	4,81	4,54	4,5
5	24	4,81	4,52	4,49
6	39	4,79	4,48	4,45
7	45	4,77	4,47	4,37

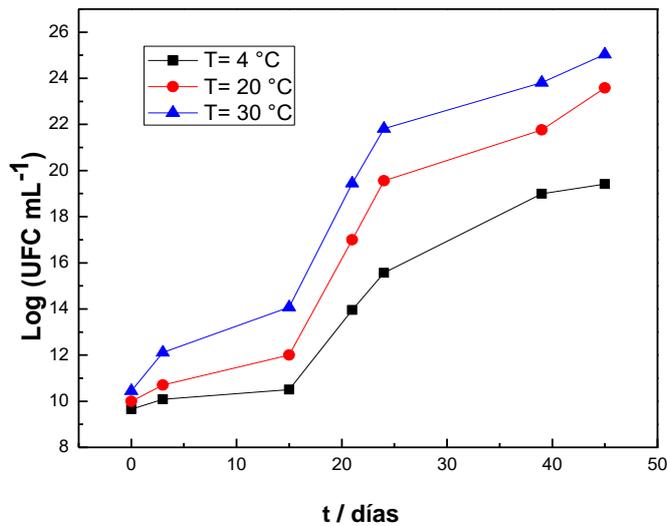
**Figura 25.**

*pH versus tiempo a diferentes temperaturas de almacenamiento*



**Tabla 22***Biomasa a diferentes temperaturas de almacenamiento*

N°	Tiempo (horas)	T= 4 °C		T= 20 °C		T= 30 °C	
		Biomasa	LOG (UFC/ml)	Biomasa	LOG (UFC/ml)	Biomasa	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

**Figura 26.***Gráfico de la biomasa a diferentes temperaturas de almacenamiento*

## 5.2 Resultados inferenciales

### 5.2.1 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 23 se observa los parámetros obtenidos con el programa

Combase. La tabla 24 muestra la velocidad de crecimiento según la temperatura de operación.

**Tabla 23**

*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

**Tabla 24**

*Velocidad de crecimiento según la temperatura*

T (°C)	μ Media (días <sup>-1</sup> )
4	0,646
20	0,919
30	0,92

Se combinó la ecuación (2.13) y la ecuación (2.14) y quedó transformada en la ecuación (5.1) que se muestra a continuación

$$\left[ \frac{\text{Velocidad de reacción a } T_2}{\text{Velocidad de reacción a } T_1} \right]^{10} = \frac{ts_{T1}}{ts_{T2}} \quad (5.1)$$

Siendo:

T<sub>1</sub>: temperatura 1 (°C)

T<sub>2</sub>: temperatura 2 (°C)

ts<sub>T1</sub>: tiempo de vida útil a T<sub>1</sub>

ts<sub>T2</sub>: tiempo de vida útil a T<sub>2</sub>

Así mismo, en el inciso 5.1.5 Estudio de la estabilidad, se determinó que el tiempo de vida útil a 4 °C fue de 30 días, con estos datos aplicados en la ecuación (5.1) se obtiene los siguientes resultados.

Si T= 20 °C

$$\left[ \frac{0,919}{0,646} \right]^{\frac{20-4}{10}} = \frac{30}{ts_{T_2}}$$

$$ts_{T_2} = 17,068 \text{ dias}$$

Si T= 30 °C

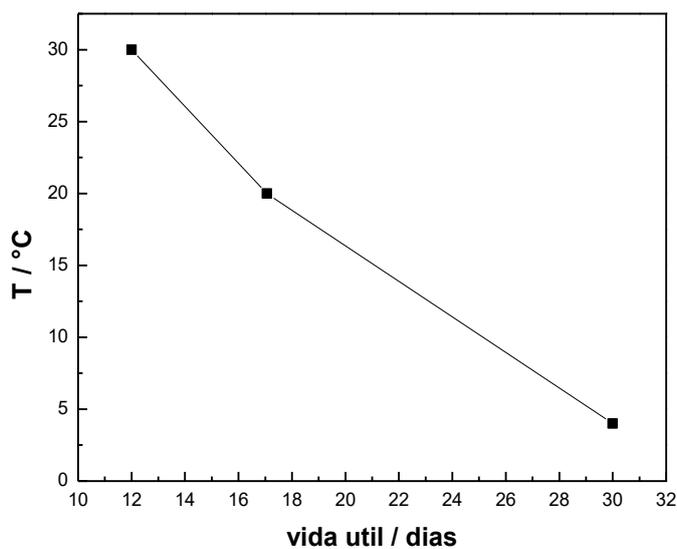
$$\left[ \frac{0,92}{0,646} \right]^{\frac{30-4}{10}} = \frac{30}{ts_{T_2}}$$

$$ts_{T_2} = 11,964 \text{ dias}$$

La tabla 25 muestra los periodos de vida útil del kéfir almacenado a 4 °C, 20 °C y 30 °C, así como la figura 27 que expresa la variación de vida útil del kéfir según la temperatura de almacenamiento utilizando el modelo de Baranyi-Roberts

**Figura 27.**

Vida útil en función de la temperatura – modelo Baranyi



**Tabla 25**

Vida útil estimada mediante modelo de Baranyi-Roberts

Temperatura (°C)	Vida útil estimada (días)
4	30,000
20	17,068
30	11,998

Aplicando la ecuación (2.15) se obtiene:

$$T = 20 \text{ °C} \quad \log(17,068) = A - B \cdot (20)$$

$$T = 30 \text{ °C} \quad \log(11,998) = A - B \cdot (30)$$

De donde se obtienen los parámetros A y B

$$A = 1,538$$

$$B = 0,015 \text{ °C}^{-1}$$

Entonces

$$\log(\theta) = 1,538 - 0,015 \cdot T \quad (5.2)$$

Donde:

$\theta$ : tiempo de vida útil (días)

T: temperatura (°C)

Contrastando a la hipótesis, si  $T = 4 \text{ °C}$ , en la ecuación (5.2)

$$\theta = 30,061 \text{ días}$$

### 5.2.2 Cálculo de la velocidad de reacción empleando el Modelo clásico

La velocidad de crecimiento se determinó con el modelo el modelo clásico, aplicado al crecimiento bacteriano con diferentes temperaturas (4 °C, 20 °C y 30 °C) realizado por el estudio de almacenamiento acelerado (tabla 22), en la tabla 26, tabla 28 y tabla 30 se muestran las velocidades de crecimiento a diferentes temperaturas. Así mismo, la tabla 27, tabla 29 y tabla 31 muestran mediante la media, el promedio de velocidad de crecimiento según temperatura, los datos se agrupan en la tabla 32.

**Tabla 26**

*Velocidad de crecimiento a 4°C*

N°	Tiempo (horas)	Biomasa	T= 4 °C	
			LOG (UFC/ml)	$\mu$ (Velocidad de crecimiento)
1	0	4,50E+09	9,653	0,142
2	3	1,20E+10	10,079	0,035
3	15	3,20E+10	10,505	0,576
4	21	9,10E+13	13,959	0,536
5	24	3,70E+15	15,568	0,228
6	39	9,80E+18	18,991	0,071
7	45	2,60E+19	19,415	

**Tabla 27**

*Análisis estadístico de velocidad de crecimiento a 4 °C*

Estadística descriptiva	Valor
Media	0,265
Error típico	0,096
Desviación estándar	0,235
Varianza de la muestra	0,055

**Tabla 28***Velocidad de crecimiento a 20°C*

N°	Tiempo (horas)	Biomasa	T= 20 °C	
			LOG (UFC/ml)	μ (Velocidad de crecimiento)
1	0	1,00E+10	10,000	0,236
2	3	5,10E+10	10,708	0,108
3	15	1,00E+12	12,000	0,833
4	21	1,00E+17	17,000	0,852
5	24	3,60E+19	19,556	0,147
6	39	5,80E+21	21,763	0,303
7	45	3,80E+23	23,580	

**Tabla 29***Análisis estadístico de velocidad de crecimiento a 20 °C*

Estadística descriptiva	Valor
Media	0,413
Error típico	0,139
Desviación estándar	0,340
Varianza de la muestra	0,115

**Tabla 30***Velocidad de crecimiento a 30°C*

N°	Tiempo (horas)	Biomasa	T= 30 °C	
			LOG (UFC/ml)	μ (Velocidad de crecimiento)
1	0	2,80E+10	10,447	0,556
2	3	1,30E+12	12,114	0,164
3	15	1,20E+14	14,079	0,895
4	21	2,80E+19	19,447	0,791
5	24	6,60E+21	21,820	0,133
6	39	6,50E+23	23,813	0,205
7	45	1,10E+25	25,041	

**Tabla 31***Análisis estadístico de velocidad de crecimiento a 30 °C*

Estadística descriptiva	Valor
Media	0,457
Error típico	0,138
Desviación estándar	0,337
Varianza de la muestra	0,113

**Tabla 32***Velocidad de crecimiento según la temperatura*

T (°C)	μ Media (días <sup>-1</sup> )
4	0,265
20	0,413
30	0,457

Del enciso 5.5, el tiempo de vida útil a 4 °C fue de 30 días, con estos datos aplicados en la ecuación (5.1) se obtiene los siguientes resultados.

Si T= 20 °C

$$\left[ \frac{0,413}{0,265} \right]^{\frac{20-4}{10}} = \frac{30}{ts_{T_2}}$$

$$ts_{T_2} = 14,750 \text{ dias}$$

Si T= 30 °C

$$\left[ \frac{0,457}{0,265} \right]^{\frac{30-4}{10}} = \frac{30}{ts_{T_2}}$$

$$ts_{T_2} = 7,274 \text{ dias}$$

A continuación, en la tabla 33, se muestra la vida útil estimada a diferentes temperaturas de almacenamiento. Y en la figura 28 se grafica la vida útil en función de la temperatura de almacenamiento por el modelo clásico.

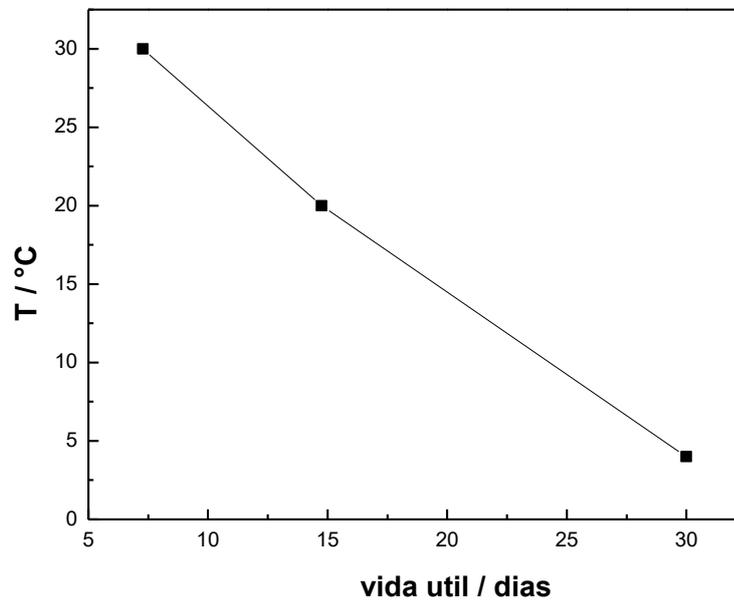
**Tabla 33**

*Vida útil mediante modelo clásico*

Temperatura (°C)	Vida útil estimada (días)
4	30,000
20	14,750
30	7,274

**Figura 28.**

*Vida útil en función de la temperatura – modelo clásico*



Para ambos casos, a temperaturas de 20 °C o 30°C la duración del producto es de 17 días.

Aplicando la ecuación (2.15) se obtiene:

$$T= 20 \text{ °C} \quad \log(14,750) = A - B \cdot (20) \quad (5.3)$$

$$T= 30 \text{ °C} \quad \log(7,274) = A - B \cdot (30) \quad (5.4)$$

De donde se obtienen los parámetros A y B

$$A=1,783$$

$$B=0,031 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$$

Entonces

$$\log(\theta) = 1,783 - 0,031 \cdot T \quad (5.5)$$

Donde:

$\theta$ : tiempo de vida útil (días)

T: temperatura ( $^\circ\text{C}$ )

Si  $T= 4 \text{ } ^\circ\text{C}$ , en la ecuación (5.5)

$$\theta = 45,604 \text{ dias}$$

## **VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **6.1 Contrastación de la hipótesis**

#### **HIPÓTESIS GENERAL**

El proceso homofermentativo con bacterias probióticas del kéfir consistió en tres etapas: activación, incubación y almacenamiento (Ver APÉNDICE N° 2). Se utilizó el diseño factorial para calcular el número de experimentos y se empleó los softwares Excel y Origin Pro 8 para expresar la estadística y las gráficas de los resultados respectivamente. Se manejó el programa Combase para determinar los parámetros de crecimiento microbiano según el modelo de Baranyi-Roberts, en las etapas del proceso homofermentativo. Después de muchos ensayos, se determinó que el tiempo de vida útil fue de 30 días ya que a partir de la fecha se observa que la viscosidad ha llegado hasta 436,8 cp (Ver tabla 21), las marcas de yogurt pasteurizado (ver ANEXO N° 8) posicionadas en el mercado peruano están hasta 291cp. Así mismo, para este tiempo, el crecimiento microbiano se encuentra en el inicio de la etapa de muerte (Ver figura 22), En la prueba sensorial, para ese día, aún es aceptado por los consumidores evaluadores, según criterio explicado en la tabla 24. El producto a lo largo de la evaluación no presentó coliformes, mohos y levaduras que perjudiquen a la salud humana. Así mismo, aplicando el método del estudio de almacenamiento, por el modelo cinético de Baranyi-Roberts, se calculó que el tiempo de vida útil es 30 días, el cual coincide con el método del estudio por estabilidad anteriormente descrito; empleando el modelo clásico, se determinó que el tiempo de vida útil es 45 días.

#### **HIPÓTESIS ESPECÍFICA**

Los parámetros de control en la etapa de activación para producir kéfir fueron: temperatura y tiempo de activación. La temperatura se estableció en 32 °C, a partir de la ficha técnica del fabricante (Lactina Ltd, 2018) y del artículo de Ingrid Suryanti (Fermented Milks- StarterCultures, 2011). El tiempo de activación fue de 18 horas y se determinó a partir de las pruebas experimentales conjuntamente con el Codex alimentario para leches fermentadas (Codex stan 243-2003, 2010).

De la tabla 14 se puede observar que entre 13H y 18H hay más que  $1 \times 10^7$  UFC/mL por tanto se puede decir que se tiene kéfir según la norma Codex (Codex stan 243-2003, 2010). A su vez, en este intervalo de tiempo, alcanza entre [0,65-0,75] de acidez.

En la etapa de incubación se determinó el volumen de cultivo y el tiempo de incubación. El volumen mínimo de cultivo madre resultó de 30 mL, al realizar un ensayo con diferentes volúmenes (Ver tabla 16). Midiendo el % de acidez, del párrafo anterior, el kéfir alcanza  $1 \times 10^7$  UFC/mL cuando se encuentra entre [0.65-0.75]% de acidez. Lo que hace suponer que al emplear 30 mL de cultivo madre por litro de leche nueva, se alcanza kéfir a las 10 h y al emplear 50 mL de cultivo madre por litro de leche nueva, se obtiene en 8 h, pero al utilizar 100 mL de cultivo madre por litro de leche nueva, el tiempo de incubación resultó mayor a 5 h. La tabla 17 permite elegir al volumen de 30 mL/L de leche puesto que el precio de costo es menor respecto a los otros volúmenes, independientemente del tiempo de incubación. Para el cálculo de tiempo de incubación se volvió a realizar la prueba con 30 mL de cultivo madre, midiendo esta vez la biomasa, pH y % de acidez, resultando 10 h tal como se había supuesto anteriormente.

El modelo de Baranyi-Roberts permitió elaborar con mayor ajuste el crecimiento microbiano y obtener la velocidad de crecimiento microbiana para la producción de kéfir.

Los parámetros fisicoquímicos que se determinaron en la elaboración del kéfir fueron: la viscosidad, la cual quedó en 852 cp., alcanzando 0,68 % acidez y su pH fue de 4,93. A estos niveles alcanzaron  $1 \times 10^7$  UFC/mL, cantidad mínima que establece el Codex para obtener kéfir.

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

Según Sasazki, quien elaboró el kéfir empleando bacterias y levaduras (proceso heterofermentativos) el producto tiene una vida en almacenamiento de 6 días a 8 °C (Sasazki-Tamaki, 1995). En la presenta tesis se determinó una duración de

30 días a 4 °C para el kéfir mediante un proceso homofermentativo utilizando bacterias probióticas típicas. El tiempo de vida útil de un yogur comercial fue de 29 días utilizando la metodología  $Q_{10}$ , almacenado a 6 °C según Sánchez, Cerrón, Canchuricra y Aquino (2013).

Según la FAO/OMS (2001) el probiótico son un conjunto de “microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada”. El kéfir es considerado un probiótico puesto que llega a alcanzar  $5,12 \times 10^{22}$  UFC/ mL en su etapa de almacenamiento, para Sánchez, Ruiz y Morales la cantidad de células viables varía de un país a otro en función de su legislación; pero por lo general un producto probiótico contiene entre  $10^6$  -  $10^{10}$  UFC/dosis de células viables. Así mismo, estos son definidos como seguros según el acrónimo inglés “GRAS” (“generally recognized as safe”) (Sánchez, Ruiz, & Morales, 2015), razón por la cual no se encontró microorganismos patógenos a lo largo del estudio realizado.

Para el cálculo de velocidad de crecimiento se realizó el modelo Baranyi-Roberts puesto que según Sancho Mamani (2015) es aceptable para utilizarlo en bacterias lácticas, presentando un  $R^2 = 0.9996$  (Sancho Mamani, 2015), similar al valor reportado desde el ANEXO N° 2 hasta el ANEXO N° 6. Del mismo modo Cayré, Vignolo y Garro (2007) utilizan el modelo Baranyi- Roberts para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas, obteniendo valores de  $R^2$  altos respecto a otros modelos planteados. Además, se contaba con el programa Combase de acceso libre y fácil de entender.

Con respecto a la variación del % de acidez y pH a diferentes temperaturas que se muestra en la figura N° 14 y en la figura N° 15 respectivamente, el comportamiento es similar al estudio realizado por Huaccha Cabrera. (2016, pág. 30)

Los tiempos de activación calculados para este proceso son menores respecto al ensayo que realiza Bensmira, Nsabimana y Jiang (2010), sin embargo,

coincide en un tiempo de activación de 18 H. Además, estos tiempos juegan un importante papel sobre las propiedades fisicoquímicas (viscosidad) del kéfir.

### **6.3 Responsabilidad ética**

El autor se responsabiliza por la información emitida en el presente trabajo de investigación, cumplimiento lo señalado en el CÓDIGO DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN D LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO Resolución N° 260-2019-CU

## **CONCLUSIONES**

El tiempo de vida útil fue 30 días a 4 °C, calculado por el método de estabilidad y el método de almacenamiento acelerado con el modelo de Baranyi-Roberts.

Los parámetros de control que se calcularon fueron: tiempo de fermentación y volumen de cultivo madre. El resultado fue 18 horas de fermentación en la etapa de activación y 8 horas en la etapa de incubación; así mismo volumen de cultivo madre fue 30 mL

La velocidad de crecimiento microbiano fue calculada por el modelo de Baranyi para cada etapa del proceso homofermentativo.

Los parámetros fisicoquímicos del kéfir resultaron: viscosidad, 852 cp., acidez 0,68 % y pH 4,93.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda estudiar los parámetros físicos como volumen de sinéresis y densidad, que caractericen al kéfir a fin de observar cómo afectan estas medidas en el tiempo de vida útil del producto.

Experimentar con otros modelos matemáticos que se ajusten a su crecimiento para observar el coeficiente de correlación y conocer con mayor exactitud su cinética.

Ensayar con otros tipos de leche para mejorar la consistencia y otros factores que puedan influir en el kéfir.

Escalar a nivel industrial la producción del kéfir.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agudelo Gomez, D. A., & Bedoya , M. O. (enero-junio de 2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*, 2(001), 38-42. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/26612999\\_Composicion\\_nutricional\\_de\\_la\\_leche\\_de\\_ganado\\_vacuno](https://www.researchgate.net/publication/26612999_Composicion_nutricional_de_la_leche_de_ganado_vacuno)
- Alais, C., & Godina, A. L. (2003). *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. (Segunda edición en español ed.). Reverté. Obtenido de [https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=bW\\_ULacGBZMC&oi=fnd&pg=PR5&dq=la+leche&ots=QMYt7-15gs&sig=LQa1pNDIT3F9IzSPmv9X19lhFgY#v=onepage&q=la%20leche&f=false](https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=bW_ULacGBZMC&oi=fnd&pg=PR5&dq=la+leche&ots=QMYt7-15gs&sig=LQa1pNDIT3F9IzSPmv9X19lhFgY#v=onepage&q=la%20leche&f=false)
- Anselmo, R. J., Viora, S. S., & Lausada, L. (2001). Información tecnológica. (J. O. Valderrama, Ed.) *CIT*, XII(5), 91-95. Obtenido de [https://books.google.com.pe/books?id=WPLrWIW7CJAC&pg=PA92&lpg=PA92&dq=nuevo+metodo+para+la+produccion+comercial+del+kefir&source=bl&ots=p2qHBtpd9Y&sig=4RwLmCTwik6EaLVYZuTLg\\_7c2SY&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwi36qDA2fjeAhUH0IMKHQ2rBS0Q6AEwA3oECAcQAQ#v=onepage&q=n](https://books.google.com.pe/books?id=WPLrWIW7CJAC&pg=PA92&lpg=PA92&dq=nuevo+metodo+para+la+produccion+comercial+del+kefir&source=bl&ots=p2qHBtpd9Y&sig=4RwLmCTwik6EaLVYZuTLg_7c2SY&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwi36qDA2fjeAhUH0IMKHQ2rBS0Q6AEwA3oECAcQAQ#v=onepage&q=n)
- Anzueto, C. R. (Ed.). (30 de agosto de 2012). *Food & Beverage Technology Summit*. Obtenido de Osmosis Consultores. Guatemala: [https://www.academia.edu/7268294/Modelos\\_matematicos\\_para\\_estimacion\\_de\\_vida\\_util\\_de\\_alimentos](https://www.academia.edu/7268294/Modelos_matematicos_para_estimacion_de_vida_util_de_alimentos)
- Apar, D.K., Demirhan, E., Ozel, B, . . . B. (2016). *Kefir Grain Biomass Production: Influence of Different Culturing Conditions and Examination of Growth Kinetic Models*. . Estados Unidos: Journal of Food Process Engineering.
- Arévalo Ortiz, F., & Quispe Cáceres, A. (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. *CIEN DES* 9, 5-10. Obtenido de <http://revistas.uap.edu.pe/ojs/index.php/CYD/article/view/1175/1151>

- Arévalo, F., & Arias, G. (2014). Estudio de la velocidad de agitación en la producción de biomasa de granos de kefir. *Ciencia e investigación*, 16-20. Obtenido de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/11088/9955>
- ArgenBio. (s.f.). Obtenido de Consejo Argentino para Información y Desarrollo de la Biotecnología: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades&note=190>
- Artica, L. (01 de septiembre de 2015). *WordPress*. Obtenido de Tecnología de Leche II: <https://luisartica.files.wordpress.com/2015/09/bacterias-lacticas-2016.pdf>
- Artica, L. (01 de Septiembre de 2015). *WordPress*. Obtenido de Cultivos iniciadores: <https://luisartica.files.wordpress.com/2015/09/los-cultivos-iniciadores-2016.pdf>
- Astiasarán, I., & Alfredo Martínez, J. (2003). *Alimentos: composición y propiedades*. Navarra: McGraw Hill.
- Athéna Zourari, E. A. (1988). Le kéfir. Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production. Une revue. *HAL*. doi:hal-00929138
- Bensmira, M., Nsabiana, C., & Jiang, B. (2010). Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. *Food Science and Technology*, 1180-1184. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/270960372\\_Effects\\_of\\_fermentation\\_conditions\\_and\\_homogenization\\_pressure\\_on\\_the\\_rheological\\_properties\\_of\\_Kefir](https://www.researchgate.net/publication/270960372_Effects_of_fermentation_conditions_and_homogenization_pressure_on_the_rheological_properties_of_Kefir)
- Cabeza Herrera, E. (2018). *DMFit web edition*. Bucaramanga, Colombia: Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Obtenido de <https://docplayer.es/83640407-Dmfit-web-edition-cabeza-herrera-e-a.html>
- Cabeza Herrera, E. A. (2015). *Cultivos Estárter: Seguridad, funcionalidad y propiedades*. Obtenido de Luis Artica WordPress: <https://luisartica.files.wordpress.com/2015/09/cultivos-starter.pdf>

- Carrillo Inungaray, M. L., & Reyes Munguía, A. (2013). Vida útil de los alimentos. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 2(3).
- Carvajal, A. M. (2017). Genética y calidad nutracéutica de la leche. *Revista Agrícola*, 36-37. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/318969376\\_Genetica\\_y\\_calidad\\_nutraceutica\\_de\\_la\\_leche](https://www.researchgate.net/publication/318969376_Genetica_y_calidad_nutraceutica_de_la_leche)
- Cayré, M., Vignolo, G. M., & Garro, O. A. (2007). Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. *SciELO*, 23-29. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v18n3/art04.pdf>
- Centro Nacional de Inspección de la Calidad. (2008). *Iniciadores lácticos, Métodos de ensayo*. La Habana- Cuba: Ministerio de la Industria Alimenticia.
- Chamba, J. F., Duong, C., Fazel, A., & Prost, F. (1994). Sélection des souches de bactéries lactiques. En H. d. Roissart, & F. M. Luquet, *Bactéries lactiques* (págs. 499-521). France: Lorica.
- Cheirsilp, B., & Radchabut, S. (2011). Use of whey lactose from dairy industry for economical kefir an production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts. *N. Biotechnol*(28), 574–580. doi:10.1016/j.nbt.2011.01.009
- Chen, H., & Hoover, D. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 82-106.
- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y., & Wang, Z. (2015). Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *Int. Dairy J.*, 15-21. doi:10.1016/j.idairyj.2014.10.004
- Codex stan 243-2003. (2010). *Norma codex para leches fermentadas*. Leche y productos lacteos (2da edición).
- Cogan, T., & Accolas, J. (1996). History and taxonomy of starter cultures. *Dairy StarterCultures*, 1-24.
- Comelli, E., Guggenheim, B., Stinglele, F., & Neeser, J. (2002). Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur J Oral Sci.*(110), 218-22.

- Commonwealth Department of Health and Aged Care. (2001). *Los termómetros y su uso en alimentos. Normas de seguridad alimentaria*. Australia: ANZFA. Obtenido de <https://www.foodstandards.gov.au/consumer/safety/faqsafety/documents/SPA%20Thermometers.pdf>
- Condalab. (2019). *Ficha Técnica "Sabouraud dextrose agar"*. España. Obtenido de <https://www.condalab.com/int/en/content/9-company>
- De la Fuente Salcido, N. M., & Barboza Corona, J. E. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*, XX(1), 43-52.
- Duitschaeffer, C., Kemp, N., & Emmons, D. (1987). Pure culture formulation and procedure for the production of kefir. *Milchwissenschaft*, 80-82.
- Espinoza Atencia, E. J. (1996). Evaluación de la vida útil de los alimentos (Shel Life): efecto de la temperatura. *Ciencia y Desarrollo*, 90-94.
- F., S. W. (1979). Role of lactobacillus in the intestinal tract. *J. Food Prot.*(42), 259.
- Fernandez, S. (2008). Vida, la ciencia de la Biología. En Sadava, Heller, Orians, Purves, & Hillis, *LIFE, The Science of Biology* (págs. 147-148). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. Obtenido de <https://books.google.com.pe/books?id=RIw3cKDaMfEC&printsec=frontcover&dq=Vida,+la+ciencia+de+la+Biolog%C3%ADa&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi324H2oNTIAhUnVt8KHVH4D6sQ6AEIKDAA#v=onepage&q&f=false>
- Forbes, B., Sahm, F., & Weissfeld, A. (2002). *Streptococcus, Enterococcus, and similar organisms. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. New York: Mosby Inc.
- Fungilab S.A. (s.f.). *Technical File*. New York: Fisher Cientific.
- Gálvez Viteri, M. A., Heras Solíz, M. E., & Romo Leroux, M. (2012). *Estudio experimental sobre la obtención de Kefir ("Leche Kefirada") en nuestro medio, partiendo de la reproducción y mantención de los Nodúlos de Kefir*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. Obtenido de Catálogo bibliográfico Universidad de Guayaquil: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/2368/1/1086.pdf>

- García Ahued, M. (s.f.). *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*. Obtenido de <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icbi/n3/m1.html#n1>
- Garre Pérez, A., Egea Larrosa, J., & Fernández Escaméz, P. (2016). Modelos Matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. *Anuario de Jóvenes Investigadores*, 9, 160-163.
- Garriga, M. (1994). *Eurocarne*. (23), 68-72.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J. Dairy Res.*(68), 639-659. doi:10.1017/S0022029901005210
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Jahanbin, K., Mohammad, S., Gharibzahedi, T., & Taheri, S. (2012). Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefir production yield from a low-cost culture medium. *Food Chem.*(133), 383-389.
- Giannuzzi, L., Pinotti, A., & Zaritzky, N. (1998). Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol*(39), 101-110.
- Gonzales Fernandez, C., Santos, E., Rovira, J., & Jaime, J. (2006). The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo- Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*(74), 467-475.
- Hanna. (2015). *Manual de Instrucciones Edge*. Chile: Hanna Instruments. Obtenido de [https://cdn.hannachile.com/hannacdn/support/manual/2015/05/manual\\_edge\\_1.pdf](https://cdn.hannachile.com/hannacdn/support/manual/2015/05/manual_edge_1.pdf)
- Himedia. (2011). *Ficha Técnica "EMB agar" M317*. India. Obtenido de <https://www.himedialabs.com/HML/Pages/default.aspx>
- Himedia. (2018). *Technical Data Lactobacillus MRS Agar M641*. India: Himedia. Obtenido de preparación de cultivos lácticos y yogur: <https://www.himedialabs.com/HML/Pages/default.aspx>
- Huaccha Cabrera, K. Y. (2016). *Estimación de la vida útil sensorial con pruebas aceleradas y estadística de supervivencia del yogur de leche de cabra descremada frutado con lúcuma (Pouteria Lucuma) y extracto de yacón*

- (*Smallanthus sonchifolius*). Trujillo, Perú: Universidad Nacional de Trujillo - Facultad de ciencias Agropecuarias. Obtenido de <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10597/HUACCHA%20CABRERA%20KYARA%20YURIKO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- lañez Pareja, E. (17 de Agosto de 1998).
- Jianzhong, Z. X. (2009). Análisis de la microflora en granos de kéfir tibetano utilizando electroforesis en gel de gradiente desnaturizante. *Microbiol alimentario*, 26, 770–775. doi:10.1016 / j.fm.2009.04.009
- Knittel, M. (1965). *Homología genética e intercambio en estreptococos de ácido láctico*. Corvallis, Oregón: Universidad Estatal de Oregón.
- Kooiman, P. (1968). The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydr. Carbohydrate Research*, VII, 200-211. doi:10.1016/S0008-6215(00)81138-6
- Kuo, C., & Lin, C. (1999). Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. *Aust. J. Dairy Tech*(54), 19-23.
- La Universidad del Zulia. (2003). *Introducción al control de calidad de la leche cruda. Guía Práctica*. Maracaibo: Departamento de Producción e Industria Animal. Obtenido de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/materialdeapoyoparapruebasdeplataforma\\_1693.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/materialdeapoyoparapruebasdeplataforma_1693.pdf)
- Labuza, T., & Riboh , D. (1982). Theory and application of Arrhenius kineticstothe prediction of nutrient losses in foods. *Food Technology*, X(36), 66-74.
- Lactina Ltd. (2018). *Analytical Report*. Bankya BG: Lactina.
- Laukuvá, A., Czikková, S., Dóbransky, T., & Burdova, O. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM4231 in milk products. *Food Microbiology*(16), 93-99.
- Levenspiel, O., & Conesa, J. A. (2004). Ingeniería de las reacciones químicas. En *Ingeniería de las reacciones químicas* ( tercera ed.). México, México: Editorial Umusa Wiley,.

- Lopitz- Otsoa, F., Rementería, A., Elguezabal, N., & Garaizar, J. (2006). Kefir: A symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*, 67-74.
- Margulis, L., Bassler, B., Sandín, M., Restrepo, J., Labrador, J., Ruipérez, V., . . . Urederra, A. (2014). Microbiótica. En L. A. Lázaro, *Microbiótica. Nutrición Simbiótica y Microorganismos Regeneradores*. España: Edición Integralia de la casa natural.
- Mayor, M. H., & Mayor, H. J. (1994). Biología. En M. H. Mayor, & H. J. Mayor, *Biología* (Séptima Edición ed., págs. 43-68). Lima: Nuevo Mundo.
- MINAGRI. (2017). *Decreto Supremo 0007-2017*. Lima Perú: Diario El Peruano.
- Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., & Ramirez Cardenas, L. (junio de 2014). Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. (C. Zambrano, Ed.) *Avances en ciencias e ingenierías*, VI(1), B60-B66. doi:1390-5384
- Mullan, W. (2011). *Dairy Science Food Technology*. Obtenido de Clasificación de los lactococos. : <https://www.dairyscience.info/index.php/cheese-starters/201-lactic-streptococci.html>
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya , Y., & Suzuki, I. (1999). Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 163-166.
- Nuñez de Villavicencio, M. (2013). Metodos de estimacion de la vida util de los alimentos. *ResearchGate*, 1-35. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/264933994\\_metodos\\_de\\_estimacion\\_de\\_la\\_vida\\_util\\_de\\_los\\_alimentos](https://www.researchgate.net/publication/264933994_metodos_de_estimacion_de_la_vida_util_de_los_alimentos)
- Nutrición, S. L. (2000). Archivos latinoamericanos de nutrición. En L. Sociedad, *Archivos latinoamericanos de nutrición* (pág. 354). Universidad de Texas. Obtenido de <https://books.google.com.pe/books?id=KjRjAAAAMAAJ>
- Oliver, F. (1943). *Tratado moderno de lechería e industrias derivadas de la leche*. Barcelona-Buenos Aires: 1943.
- Orla-Jensen, S. (1919). *The Lactic Acid Bacteria*. *Host & Son: Copenhagen*, 1-196.

- Palazón, M., Pérez Conesa, D., Abellán, P., Ros, G., Romero, F., & Vidal, M. (2009). Determination of shelf-life of homogenized apple-based beverage storage at different temperature using Weibull hazard model. *LWT Food Science and Technology*, 42(4), 319-326.
- Parente, E., & Hill, C. (1992). Inhibition of *Listeria* in buffer, broth and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Journal of Food Protection*(55), 503-508.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias Acido Lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de ciencias Agropecuarias*, 93-105.
- Paseiro, L. P. (1980). *Control de calidad de la leche*. Chile: Facultad de Santiago.
- Perez Flores, J., Castañeda Ovando, A., Jaimez Ordaz, J., Añorve Morga, J., Gonzales Olivares, L., Ramirez Godinez, J., & Contreras Lopez, E. (2017). Modelo Matemático para la estimación de la vida útil de compotas de mango y durazno durante su almacenamiento a diferentes temperaturas. *Area Académica de Química. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, 544-549.
- Perez, I. B. (26 de marzo de 2013). *Blogspot*. Obtenido de Biología 2: [http://bio2bachmr.blogspot.com/2013/03/kefir\\_26.html](http://bio2bachmr.blogspot.com/2013/03/kefir_26.html)
- Pogačić, T. S. (2013). Microbiota de granos de kéfir. *Mljekarstvo*, 63, 3–14. Obtenido de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01177/full>
- Pons Muzzo, G. (1985). *Fisicoquímica*. Lima: Universo S. A.
- Prado, M. R., Bladón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz - Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, 32-41. doi:10.3389/fmicb.2015.01177
- Ramírez, R. O. (2006). *Ingeniería bioquímica*. Obtenido de [http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe\\_2006/1038967/13\\_c09.pdf](http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe_2006/1038967/13_c09.pdf)
- Ramírez-Benítez, Vales Bautista, Caamal- Velázquez, Lizama-Uc, Rodríguez-Ávila, J.E., U., . . . N.L., I. (19 de septiembre de 2016). Producción de biomasa en la fermentación de leche por gránulos de kéfir. *Revista del Centro de Graduados e Investigación*(63), 187-188. doi:0185-6294

- Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2006). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Int. Dairy J.*, 16, 33–39. doi:10.3168/jds.2012-5753
- Roberts, M., & Yarunin, S. (2018). *Just food*. (D. Best, Ed.) Obtenido de New Nutrition Business: [https://www.just-food.com/analysis/danone-moves-into-russian-kefir-market\\_id93809.aspx#](https://www.just-food.com/analysis/danone-moves-into-russian-kefir-market_id93809.aspx#)
- Rodriguez Arévalo, A. C. (2003). Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 55-70.
- Romero Machado, E., & Héctor Ardisana, E. (2016). Efecto de la nisina sobre la conservación del helado tipo italiano. *Revista Ciencia UNEMI*, 93-99. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5774765.pdf>
- Ross, T., & McMeekin, T. A. (1994). Review Paper: Predictive Microbiology. *International Journal of Food Microbiology*(23), 241-264.
- Sadava, Heller, Orians, Purves, & Hillis. (2008). Vías que producen Energía Química. En Sadava, Heller, Orians, Purves, & Hillis, *VIDA La Ciencia de la Biología* (pág. 147). Estados Unidos: Editorial Medica Panamericana.
- Salas, S. S., & Valadez, M. E. (mayo de 2014). Caracterización e identificación molecular de bacterias asiladas de kéfir. *Agro Productividad*, VII(3), 12-20. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/275891226\\_Caracterizacion\\_e\\_identificacion\\_molecular\\_de\\_bacterias\\_aisladas\\_de\\_kefir](https://www.researchgate.net/publication/275891226_Caracterizacion_e_identificacion_molecular_de_bacterias_aisladas_de_kefir)
- Sánchez, M. T., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Asr Pharm*, 56(1), 45-59. Obtenido de <http://scielo.isciii.es/pdf/ars/v56n1/especial2.pdf>
- Sánchez, R., Cerrón, F., Canchuricra, J., & Aquino, M. (26 de julio de 2013). Vida útil del yogurt bionatural usando el método del valor q10 y análisis de supervivencia. *Escuela de Post Grado, Especialidad en Tecnología de Alimentos UNALM*, 1-13. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/237552917/Vida-util-yogur-Bionatural-pdf>
- Sancho Mamani, R. F. (2015). *Ajuste de Modelos Matemáticos de crecimiento de bacterias lácticas en queso tipo paria en condiciones isotérmicas y no*

*isotérmicas*. Puno, Perú: Universidad Nacional del Altiplano - Facultad de Ciencias Agrarias.

- Sasazki-Tamaki, D. (1995). *Elaboración de kéfir (Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias)*. Universidad Nacional Agraria La Molina: Facultad de Industrias Alimentarias.
- Siegenthalerm.E., R. T. (1964). L'emballage des laits fermentés. En F.-I. A. Bull., *Fermented Milks Part III* (págs. 113-114).
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*(70), 331-345. Obtenido de <http://www.acuedi.org/ddata/1598.pdf>
- Suryanti Surono, I. (2011). Fermented Milks- StarterCultures. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2, 477-482. doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00181-3.
- Tamine, A., Muir, D., & Wszolek, M. (1999). Kefir, Koumiss and Kishk. *Dairy Ind. Int*, 5(65), 32-33.
- Tatiana Beldarraín\*, Y. C. (2008). Caracterización de cultivos iniciadores en productos cárnicos. Parte I. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 18(2), 8-15. Obtenido de <https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/4896/Tatiana%20Beldarrain.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Editorial Medica Panamericana. Obtenido de <https://books.google.com.pe/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA168&dq=medios+de+cultivo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjQ8qGJqpXfAhVO2FkKHb8hDVcQ6AEILDAB#v=onepage&q=medios%20de%20cultivo&f=false>
- Universidad de Tasmania. (18 de noviembre de 2019). *Combase*. Obtenido de Combase: <https://browser.combase.cc/DMFit.aspx>
- Universidad Internacional de Valencia*. (21 de Marzo de 2018). Obtenido de CIENCIAS DE LA SALUD. Así ocurre la nutrición celular en el ser humano.: <https://www.universidadviu.com/nutricion-celular/>
- University of Guelph*. (s.f.). (Food Science) Obtenido de Departamento de Ciencia de los Alimentos: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/starter-cultures>

- Valbuena, E., Barreiro, J., Sánchez, E., Castro, G., Kutchinskaya, V., & Briñez, W. (2008). Predicción del crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* en leche descremada estéril en función a la temperatura. *Scientific Electronic Library Online SciELO* 20, 1-23. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/959/95911659014.pdf>
- Veisseyre, R. (1988). Zaragoza España: Acribia.
- Vidal Rosell, D., Fernandez Ferrer, M., & Alfonso Sabatier, C. (2008). Meningitis bacteriana por *Lactococcus lactis* *Cremoris*. *SCielo*, 1- 3. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602008000300015](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000300015)
- Wang, Y. P., Li, C., Liu, P., Zaheer, A., Xiao, P., & Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr. Polym.*, 82, 895–903. doi:10.1016/j.carbpol.2010.06.013
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., & Song, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *Int. J. Biol. Macromol*, 43, 283-288. doi:10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011
- Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., & Aslım, B. (2004). Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *Food Sci. Technol*(37), 663-667.
- Zajšek, K., Kolar, M., & Goršek, A. (2011). Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *Int. J. Dairy Technol.*(64), 544-548. Obtenido de [10.1111/j.1471-0307.2011.00704.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00704.x)
- Zanirati, D. F., Abatemarco, M., Cicco Sandesb, S. H., Nicolía, J. R., Nunes, A. C., & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*(32), 70-76. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.12.007

## ANEXO

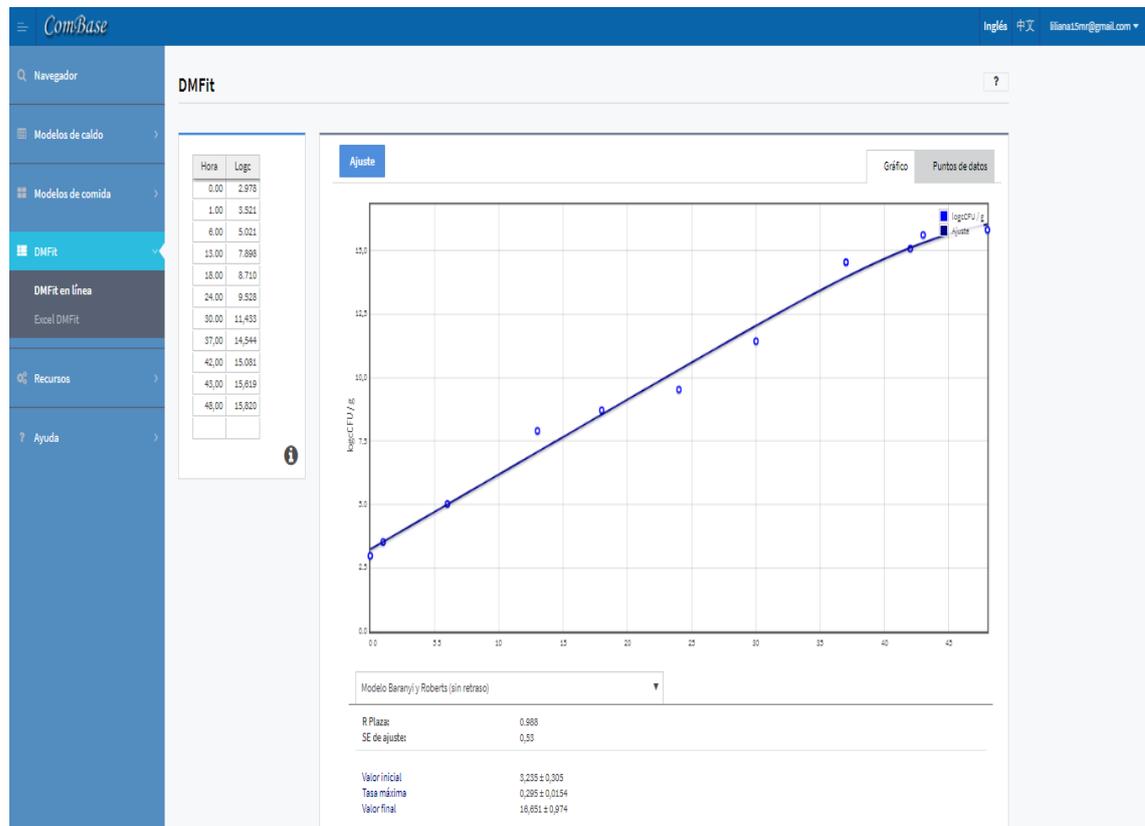
### ANEXO N° 1

#### MATRIZ DE CONSISTENCIA COMPLETA: PROCESO HOMOFERMENTATIVO DE KEFIR CON BACTERIAS PROBIÓTICAS TÍPICAS PARA PROLONGAR SU TIEMPO DE VIDA ÚTIL

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VA. DEPEN.	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿Será factible el proceso homofermentativo de kéfir con bacterias probióticas típicas para prolongar su tiempo de vida útil?	Determinar el tiempo de vida útil del kéfir usando un proceso homofermentativo	Si se establece un proceso homofermentativo con bacterias probióticas del kéfir entonces se prolongará su tiempo de vida útil.	X= Proceso Homofermentativo de kéfir con bacterias probióticas típicas para prolongar su tiempo de vida útil.	Tiempo de vida útil	días	Relacionando las variables independientes mediante un modelo adecuado que cumpla con las condiciones establecidas se comprobará que el proceso homofermentativo alarga la vida útil del producto.
PROB. ESPECÍFICOS	OBJ. ESPECÍFICOS	HIP. ESPECÍFICAS	VA. INDEPEN.	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿Cuáles son los parámetros de control para la obtención de kéfir?	Determinar los parámetros de control para la obtención del kéfir.	Los parámetros de control para la obtención del kéfir, permitirán obtener un producto óptimo.	X <sub>1</sub> = Parámetros de control para la obtención del kéfir.	Temperatura Acidez Tiempo de fermentación Concentración	°C pH h %	Los parámetros de control serán determinados después de un análisis riguroso habiendo evaluado tecnologías para la obtención del kéfir.
¿Cuál es la cinética de crecimiento microbiano de las bacterias probióticas homofermentativas para la producción de kéfir?	Determinar la cinética de crecimiento microbiano para la producción de kéfir.	Los fundamentos de la cinética de la reacción microbiana adecuada nos permitirán determinar el modelo matemático de la velocidad de crecimiento microbiana para la producción de kéfir.	X <sub>2</sub> = Modelo matemático de la cinética de reacción microbiana para la producción de kéfir.	fases de latencia ( $\lambda$ ), logarítmica ( $\mu$ ) , tiempo generacional ( $t_g$ ) y fase estacionaria de los microorganismos del kéfir	UFC/g	El análisis microbiano, permitirá hallar la cinética de reacción en función de concentración y tiempo.
¿Cuáles son los parámetros fisicoquímicos en la elaboración del kéfir con bacterias probióticas?	Determinar los parámetros fisicoquímicos en la elaboración del kéfir.	Los parámetros fisicoquímicos en la elaboración de kéfir con culturas iniciadoras permitirán caracterizar al kéfir comercial.	X <sub>3</sub> = Parámetros fisicoquímicos.	Acidez valorable pH viscosidad	%w/w	Los parámetros fisicoquímicos en la elaboración de kéfir con culturas de iniciadoras serán extraídos del CODEX STAN 243-2003

## ANEXO N° 2

### DATOS SIMULADOS POR COMBASE EN ETAPA DE ACTIVACIÓN



TIEMPO	LOG (UFC/g)
0	3,23
0,96	3,52
1,92	3,8
2,88	4,08
3,84	4,37
4,8	4,65
5,76	4,93
6,72	5,22
7,68	5,5
8,64	5,78
9,6	6,07
10,56	6,35
11,52	6,63
14,4	7,48
15,36	7,77
16,32	8,05
17,28	8,33

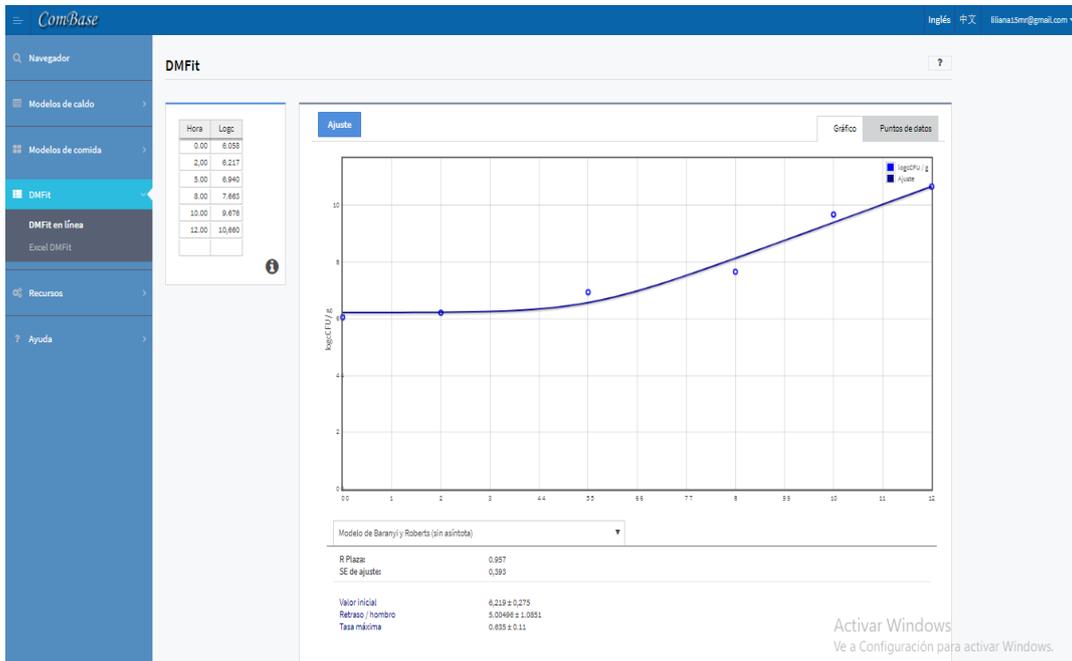
TIEMPO	LOG (UFC/g)
17,28	8,33
18,24	8,61
19,2	8,9
20,16	9,18
21,12	9,46
22,08	9,74
23,04	10,02
24	10,3
24,96	10,58
25,92	10,86
26,88	11,14
27,84	11,42
28,8	11,7
29,76	11,97
30,72	12,25
31,68	12,52

TIEMPO	LOG (UFC/g)
32,64	12,79
33,6	13,05
34,56	13,32
35,52	13,57
36,48	13,82
37,44	14,07
38,4	14,31
39,36	14,54
40,32	14,76
41,28	14,97
42,24	15,16
43,2	15,34
44,16	15,51
45,12	15,67
46,08	15,81
48	16,04

Combase (Universidad de Tasmania, 2019)

## ANEXO N° 3

### DATOS SIMULADOS POR COMBASE EN ETAPA DE INCUBACIÓN



TIEMPO	LOG (UFC/g)
7,68	7,94
7,92	8,08
8,16	8,23
8,4	8,38
8,64	8,53
8,88	8,69
9,12	8,84
9,36	8,99
9,6	9,14
9,84	9,29
10,08	9,44
10,32	9,6
10,56	9,75
10,8	9,9
11,04	10,05
11,28	10,21
11,52	10,36
12	10,66

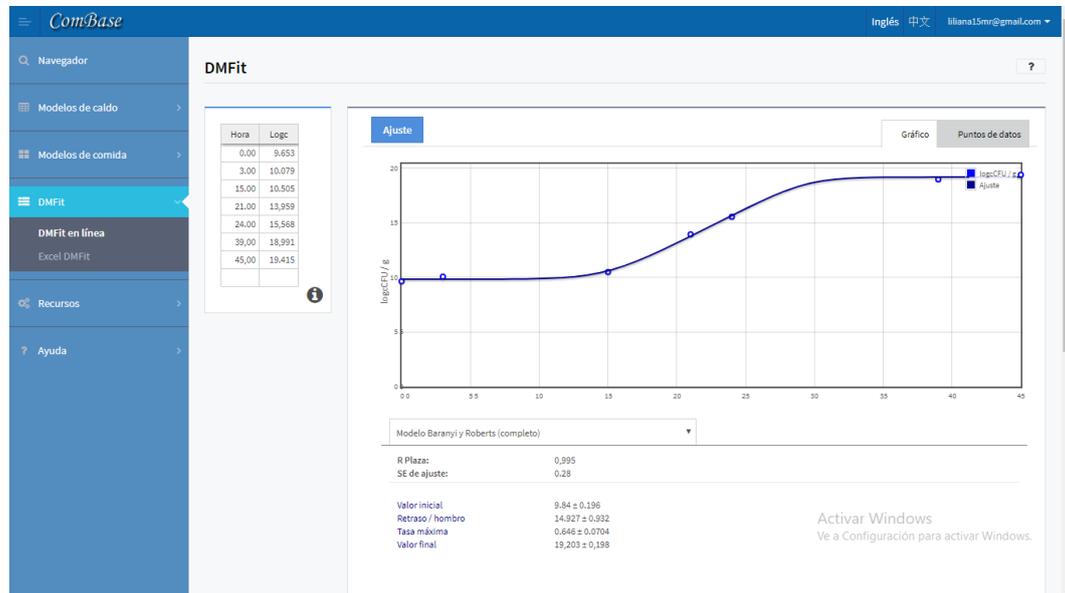
TIEMPO	LOG (UFC/g)
3,6	6,3
3,84	6,33
4,08	6,36
4,32	6,4
4,56	6,45
4,8	6,51
5,04	6,58
5,28	6,67
5,52	6,76
5,76	6,87
6,06	6,98
6,24	7,1
6,48	7,23
6,72	7,37
6,96	7,5
7,2	7,65
7,44	7,79

TIEMPO	LOG (UFC/g)
0	6,22
0,24	6,22
0,48	6,22
0,72	6,22
0,96	6,22
1,2	6,22
1,44	6,22
1,68	6,23
1,92	6,23
2,16	6,23
2,4	6,24
2,64	6,24
2,88	6,25
3,12	6,27
3,36	6,28
3,6	6,3

Combase (Universidad de Tasmania, 2019)

## ANEXO N° 4

### DATOS SIMULADOS POR COMBASE EN ETAPA DE ALMACENAMIENTO A 4° C

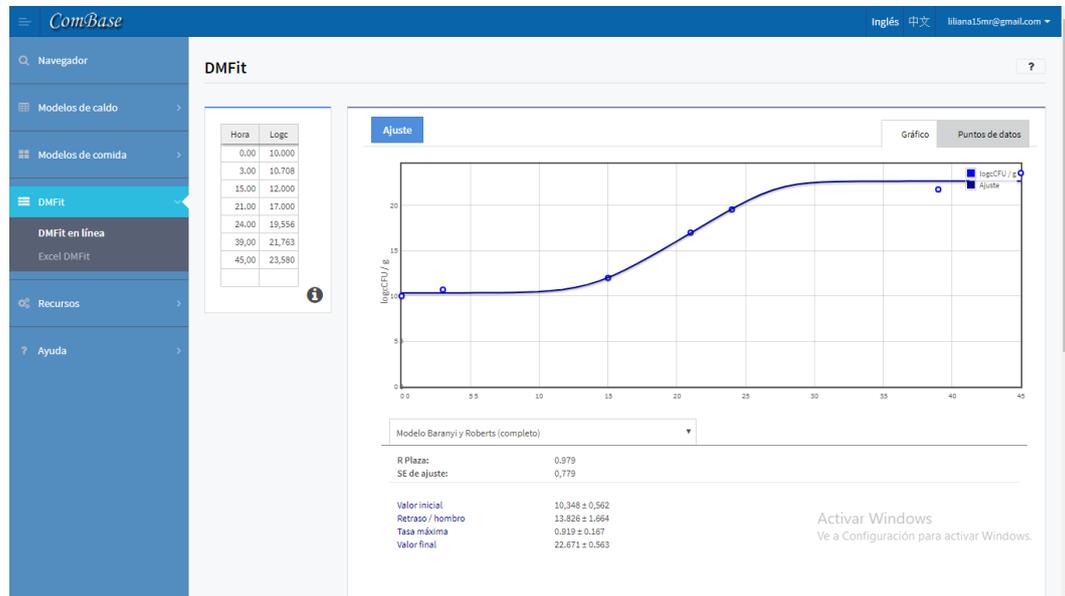


TIEMPO	LOG (UFC/g)	TIEMPO	LOG (UFC/g)	Tiempo (h)	Valor ajustado
27,9	17,94	13,5	10,23	0	9,84
28,8	18,33	14,4	10,43	0,9	9,84
29,7	18,64	15,3	10,72	1,8	9,84
30,6	18,86	16,2	11,08	2,7	9,84
31,5	19	17,1	11,51	3,6	9,84
32,4	19,09	18	11,99	4,5	9,84
33,3	19,14	18,9	12,5	5,4	9,84
34,2	19,17	19,8	13,04	6,3	9,85
35,1	19,18	20,7	13,6	7,2	9,85
36	19,19	21,6	14,16	8,1	9,86
36,9	19,2	22,5	14,73	9,9	9,87
37,8	19,2	23,4	15,3	9,9	9,89
38,7	19,2	24,3	15,87	10,8	9,93
39,6	19,2	25,2	16,43	11,7	9,99
40,5	19,2	26,1	16,97	12,6	10,08
41,4	19,2	27	17,48	13,5	10,23
42,3	19,2				
43,2	19,2				
45	19,2				

Combase (Universidad de Tasmania, 2019)

## ANEXO N° 5

### DATOS SIMULADOS POR COMBASE EN ETAPA DE ALMACENAMIENTO A 20° C

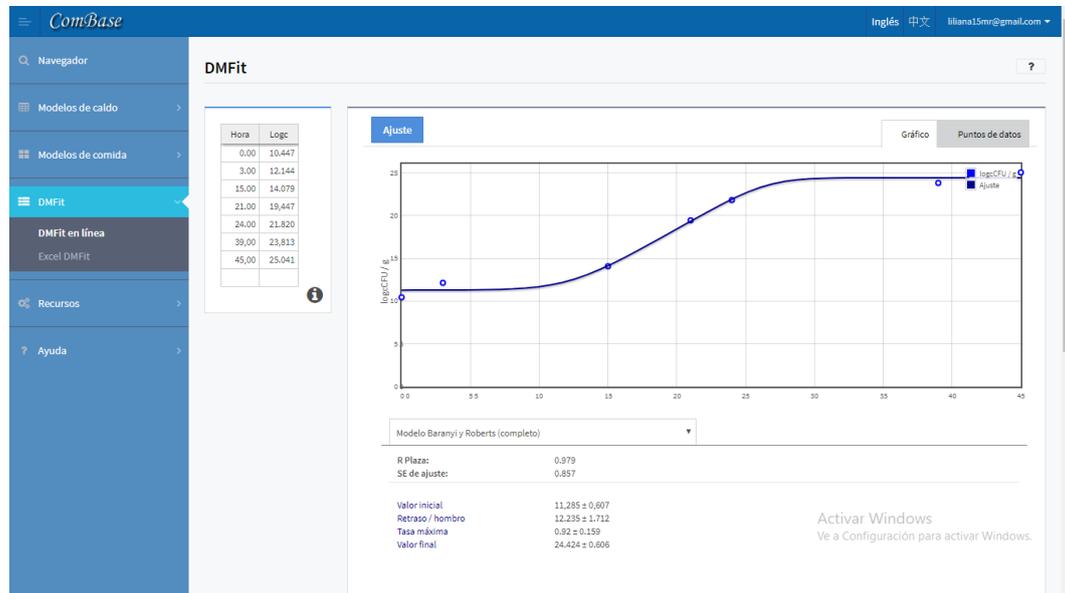


Tiempo (h)	Valor ajustado	TIEMPO	LOG (UFC/g)	TIEMPO	LOG (UFC/g)
0	10,35	14,4	11,68	29,7	22,49
0,9	10,35	15,3	12,22	30,6	22,57
1,8	10,35	16,2	12,85	31,5	22,62
2,7	10,35	17,1	13,55	32,4	22,64
3,6	10,35	18	14,3	33,3	22,66
4,5	10,35	18,9	15,07	34,2	22,66
5,4	10,36	19,8	15,87	35,1	22,67
6,3	10,36	20,7	16,68	36	22,67
7,2	10,37	21,6	17,49	36,9	22,67
8,1	10,39	22,5	18,29	37,8	22,67
9,9	10,43	23,4	19,08	38,7	22,67
9,9	10,48	24,3	19,84	39,6	22,67
10,8	10,57	25,2	20,56	40,5	22,67
11,7	10,71	26,1	21,19	41,4	22,67
12,6	10,93	27	21,7	42,3	22,67
13,5	11,25	27,9	22,08	43,2	22,67
14,4	11,68	28,8	22,34	45	22,67

Combase (Universidad de Tasmania, 2019)

## ANEXO N° 6

### DATOS SIMULADOS POR COMBASE EN ETAPA DE ALMACENAMIENTO A 30° C

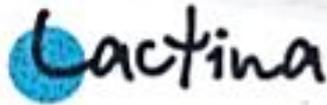


Tiempo (h)	Valor ajustado	TIEMPO	LOG (UFC/g)	TIEMPO	LOG (UFC/g)
0	11,28	14,4	13,69	29,7	24,29
0,9	11,29	15,3	14,37	30,6	24,35
1,8	11,29	16,2	15,09	31,5	24,38
2,7	11,29	17,1	15,86	32,4	24,4
3,6	11,3	18	16,65	33,3	24,41
4,5	11,3	18,9	17,45	34,2	24,42
5,4	11,32	19,8	18,25	35,1	24,42
6,3	11,34	20,7	19,06	36	24,42
7,2	11,37	21,6	19,87	36,9	24,42
8,1	11,43	22,5	20,66	37,8	24,42
9,9	11,52	23,4	21,42	38,7	24,42
9,9	11,67	24,3	22,13	39,6	24,42
10,8	11,88	25,2	22,77	40,5	24,42
11,7	12,18	26,1	23,31	41,4	24,42
12,6	12,58	27	23,72	42,3	24,42
13,5	13,09	27,9	24	43,2	24,42
14,4	13,69	28,8	24,18	45	24,42

Combase (Universidad de Tasmania, 2019)

**ANEXO N° 7**

**FICHA TÉCNICA DEL CULTIVO STARTER**



LACTINA Ltd. Banskya, Bulgaria  
 web: www.lactina-bd.com  
 e-mail: info@lactina-bd.com

**ANALYTICAL REPORT**

No.108 - III / 03.08.2018

1. Product:	Freeze - dried starters - DVS application for kefir
2. Composition:	Lactococcus cremoris, Lactococcus lactis, Lc. diacetylactis, Lactobacillus kefir.
3. No :	0818
4. Quantity:	500 pcs
5. Exp. Date:	08.2019.

	NORM	RESULT
<b>Physical &amp; Chemical data:</b>		
- dry matter	not less than 94%	conform specif.
- acidification activity		
kefir DVS ( 30-32°C)		12 - 14 h pH - 4.70 / 100°F
<b>Microbiological data:</b>		
- lactic acid bacteria CFU / g (FIL-IDF 146:1991,149:2010)	>5 x 10 <sup>8</sup>	1.25 x 10 <sup>10</sup>
- Enterobacteriaceae: (FIL-IDF 310:1998,170A-1(1999))	negative 1g	conform spec.
- Yeast and mould: (FIL-IDF 94 B:1990)	negative 1g	conform spec.
- Staphylococcus aureus: (FIL-IDF 60 C:1997)	negative 1g	conform spec.
- Salmonellae: (FIL-IDF 93 B : 1995).	negative 25 g	conform spec.

**Conclusion: The freeze-dried cultures meet specification in correspondence with Protocol A1691,1692/16.04.2018.**

03.08.2018, Banskya, BG

Lab:.....

Dr. E. Karavanova

General manager:.....

eng. G. Georgiev



**ANEXO N° 8****CUADRO DE VISCOSIDAD DE DIFERENTES YOGURES EN MERCADO NACIONAL**

NOMBRE COMERCIAL	DESCRIPCIÓN	MICROORGANISMOS PRESENTES	VISCOSIDAD (cp) - 100 RPM
YOFRESH	Alimento lácteo pasteurizado a partir del yogur	-	291.5
DANLAC	Yogurt natural	sabor <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus del brueckii</i> <i>subsp, bulgaricus</i>	2177.9
PIAMONTE	Natural yogur	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	1310.3
PRO	Bebida láctea alta en proteínas	-	304,6

---

Elaboración propia

## ANEXO N° 9

### PRUEBA DE ANÁLISIS SENSORIAL SIN ESCALA HEDÓNICA

Nombre:	Edad:	Fecha:
---------	-------	--------

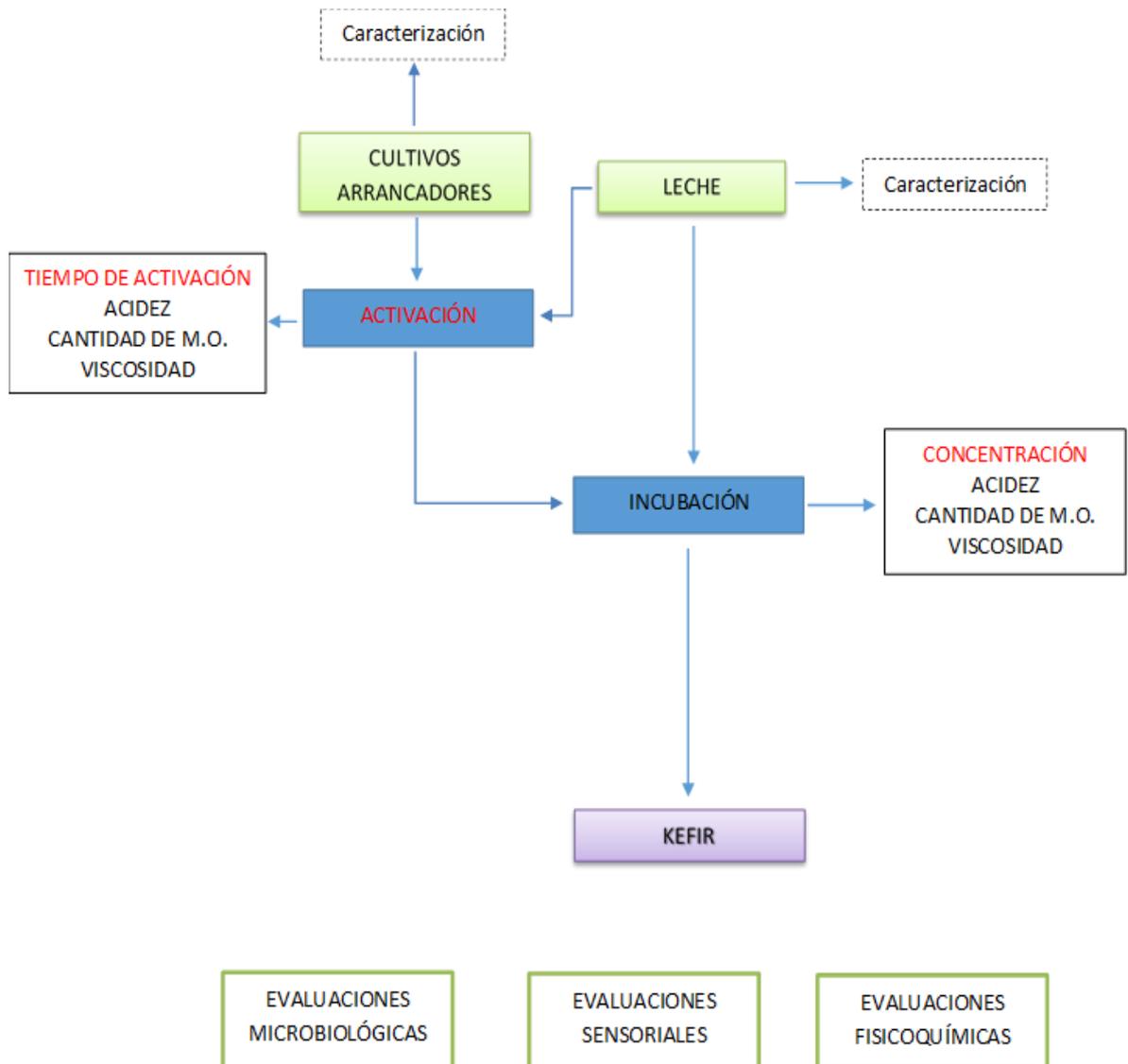
¿ACEPTA los siguientes atributos? Marque con una X su respuesta

OLOR:	SI	NO
SABOR:	SI	NO
COLOR:	SI	NO
TEXTURA:	SI	NO
ACEPTABILIDAD	SI	NO

Comentarios/Sugerencias:

## ANEXO N° 10

### DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO HOMOFERMENTATIVO



**ANEXO N° 11**  
**ENSAYOS FISICOQUÍMICOS**

- **Medición de viscosidad**



- **Medición de % acidez**



- **Medición de pH**



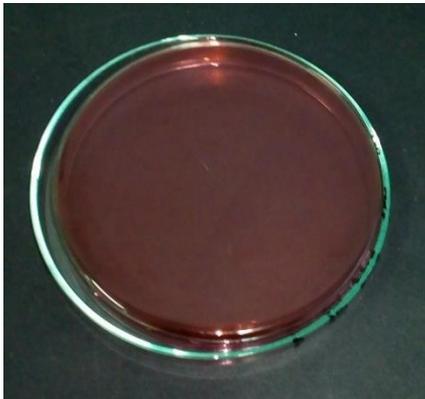
## ANEXO N° 12

### ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

- CON AGAR MRS (para determinar el número de células viables de *Lactobacillus*)



- CON AGAR EMB (para determinar contaminación de coliformes)



- CON AGAR SABOURAUD (para determinar contaminación por mohos y levaduras)

