

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**ESTANDARIZACION DEL PROCESO DE FERMENTACION DE LECHE**  
**ENTERA ULTRAPASTEURIZADA CON GRANULOS DE KEFIR**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR**

ANA GUADALUPE SANTOS ROSA

DAMARIS SARAI VEGA ROMERO

**PARA OPTAR AL GRADO DE**

**LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

JUNIO, 2012

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

**SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

**SECRETARIO**

LIC. REMBERTO MIXCO LÓPEZ

## **COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION**

### **COORDINADORA GENERAL**

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

### **ASESORAS DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS Y QUIMICA AGRICOLA**

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

MAe. María Elisa Vivar de Figueroa

### **DOCENTES DIRECTORAS**

MSc. Verónica Carmelina Díaz Avilés

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro Dios supremo, a Jesús nuestro fiel amigo y al Espíritu Santo porque han sido nuestra guía, ayudador y porque nos han dado perseverancia aún en momentos difíciles, para poder culminar esta meta con éxito.

A nuestros padres, porque nos acompañaron siempre, brindándonos sabiduría a través de sus consejos, por haberse esforzado en que lográramos graduarnos y a nuestros hermanos por su apoyo incondicional.

Al comité de trabajo de graduación: Coordinadora general, Licda. Odette Rauda, Asesoras de área: MSc. Ena Edith Herrera Salazar, MAe. María Elisa Vivar de Figueroa, Docentes Directoras: MSc. Verónica Carmelina Díaz Avilés y MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez, gracias por su paciencia, consejos y por orientarnos a lo largo de la realización de este trabajo de Graduación.

A MSc. Mirna Lorena Sorto, por asesorarnos en la parte estadística de este trabajo de graduación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud CENSALUD y su personal, por su colaboración y amabilidad durante el desarrollo de la parte experimental de este trabajo de graduación.

A nuestros profesores por compartir con nosotras sus conocimientos y habilidades durante el transcurso de nuestra carrera.

Ana y Damaris

## DEDICATORIA

A mi Dios por haberme dado fortaleza, perseverancia y fe cuando más lo necesitaba, porque para Él no hay nada imposible, logré culminar con éxitos esta etapa de mi vida, a pesar de tener desalientos y obstáculos nunca apartó de mi sus bendiciones, ni su favor. Te agradezco todo lo que has hecho por mi Señor, porque cuando confío en mis capacidades los resultados no son muy alentadores, pero cuando deposito en ti mi confianza todo sale bien.

A mis padres Ana Mirian Rosa y Mario Santos Ramírez, por no perder su confianza en mí y brindarme su apoyo incondicional en todo momento, sin importar que mis decisiones fueran obstinadas. Por esos consejos y palabras de aliento que me ayudaron a llegar hasta el final, por su amor y comprensión que ha hecho motivarme siempre a seguir adelante aun en los momentos de mayor dificultad y por enseñarme a tener paciencia, luchando siempre hasta alcanzar mis metas y nunca darme por vencida. Gracias mamá y papá por ser lumbreras en mi camino.

A mis hermanos Joselin, Tania, Carlos y Alfredo, que con su forma de ser tan diferentes entre sí me ayudaron a terminar esta carrera, para así motivarlos a ser profesionales y buenos cristianos. Los quiero mucho.

A mi compañera de tesis Damaris Sarai Vega Romero, por su comprensión y ayuda en cada etapa de este trabajo. Gracias por apoyarme y compartir momentos de adversidad y triunfo.

Ana Guadalupe Santos Rosa.

## **DEDICATORIA**

A mi Dios omnipotente, a Jesús mi fiel amigo, por haberme dado salud, protección, sabiduría e inteligencia, por estar conmigo en momentos de dificultad y permanecer siempre fiel a sus promesas, al Espíritu Santo por ayudarme a superar todo obstáculo desde el inicio hasta el fin de esta meta muy importante en mi vida y por enseñarme que al tener fe en Él todo lo puedo lograr. Gracias mi Dios, porque sé que todo lo que he alcanzado lo debo sólo a Ti.

A Julio Ernesto Vega Torres y Blanca Alicia Romero de Vega, porque son un gran ejemplo en mi vida. Por sus oraciones; por infundirme un carácter emprendedor para iniciar un camino largo con un paso decidido y firme; por brindarme ese amor y apoyo incondicional. Por sus sabios consejos que me daban aliento en momentos difíciles enseñándome que para todo hay solución si tengo como prioridad a mi Señor Jesús en la vida. Por su gran esfuerzo y sacrificio que hacían motivarme a seguir adelante. Gracias papá y mamá porque son excelentes padres, los mejores del mundo.

A mi hermana Eunice Abigail Vega Romero, por comprenderme y apoyarme incondicionalmente, por alegrarme y ser mi amiga.

A toda mi familia, mis abuelos, mis tíos y mis primos, por sus oraciones y sus buenos deseos para que culminara con éxito esta meta.

A Leonel Adonis Peña, mi novio, por sus oraciones, comprensión, consejos, su apoyo incondicional y por animarme a seguir adelante en los momentos difíciles.

A mi compañera de tesis Ana Guadalupe Santos Rosa, por compartir muchos momentos juntas, gracias, que nuestro Dios te colme de bendiciones.

Damaris Sarai Vega Romero

## INDICE

	Pág.
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0.INTRODUCCION	XX
CAPITULO II	
2.0.OBJETIVOS	
CAPITULO III	
3.0.MARCO TEORICO	25
3.1.Probióticos	25
3.2.Leches fermentadas	27
3.2.1.Historia	27
3.2.2.Definiciones	28
3.2.3.Clasificación de las leches fermentadas	29
3.2.3.1.Yogurt	29
3.2.3.2.Kumis	29
3.2.3.3.Lече fermentada con gránulos de Kéfir	30
3.3.Materias primas utilizadas en la elaboración de leche fermentada con gránulos de kéfir	30
3.3.1.Lече	30
3.3.1.1.Lече pasteurizada	31
3.3.1.2.Lече ultrapasteurizada (UHT)	31
3.3.2.Gránulos de kéfir	32
3.4.Métodos utilizados para la elaboración de leche fermentada con gránulos de kéfir	33
3.4.1.Método tradicional	33
3.4.2.Método ruso	34

3.4.3.Método industrial	34
3.5.Utensilios empleados en la elaboración de leche fermentada con gránulos de kéfir	35
3.6.Características fisicoquímicas de la leche fermentada con gránulos de kéfir	36
3.7.Composición de la leche fermentada con gránulos de kéfir	37
3.8.Propiedades de los metabolitos producidos durante la fermentación y de la leche fermentada con gránulos de kéfir	39
3.8.1.Actividad probiótica	39
3.8.2.Actividad antimicrobiana y cicatrizante de un medio de cultivo fermentado con gránulos de kéfir y del kefirán	40
3.8.3.Actividad antimicrobiana del ácido acético producido durante la fermentación de la leche con gránulos de kéfir	41
3.8.4.Efecto de desintoxicación o eliminación de ocratoxina A en alimentos por BAL	42
3.9.Conservación de los gránulos de kéfir	43
3.10.Conservación de la leche fermentada con gránulos de kéfir	44
3.11.Control de calidad de las leches fermentadas	44
3.11.1.Control sanitario	45
3.11.2.Requisitos de calidad de leches fermentadas	45
3.11.2.1.Requisitos generales de leches fermentadas	45
3.11.2.2.Características sensoriales	46
3.11.2.3.Requisitos químicos de acuerdo a la Norma del CODEX para Leches Fermentadas CODEX STAN 243-2003	47
3.11.2.4.Requisitos microbiológicos de acuerdo con la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones	48
3.11.3.Características esenciales de elaboración	48



CAPITULO IV	
4.0.DISEÑO METODOLOGICO	50
4.1.Tipo de estudio	50
4.1.1.Prospectivo	50
4.1.2. Experimental	50
4.2.Investigación bibliográfica	50
4.3.Investigación de campo	51
4.4.Parte Experimental	51
4.4.1.Activación y producción de los gránulos de kéfir a nivel de laboratorio	51
4.4.2.Acondicionamiento de los gránulos de kéfir a 25°C, 30 °C y 35 °C	52
4.4.3.Fermentación de la leche entera ultrapasteurizada con los gránulos de kéfir a 25 °C, 30 °C y 35 °C	53
4.4.4.Selección de las condiciones óptimas de fermentación	54
4.4.5.Determinaciones fisicoquímicas realizadas durante el proceso de fermentación y análisis del producto idóneo	55
4.4.6.Determinaciones fisicoquímicas	57
4.4.7.Análisis microbiológico	63
CAPITULO V	
5.0.RESULTADOS	67
CAPITULO VI	
6.0.CONCLUSIONES	99
CAPITULO VII	
7.0.RECOMENDACIONES	102
BIBLIOGRAFIA	
GLOSARIO	
ANEXOS	

## INDICE DE ANEXOS

### Anexo N°

1. Composición de la leche fermentada con gránulos de kéfir y comparación nutricional de la leche fermentada con gránulos de kéfir con otras leches.
2. Flujograma de la estandarización del proceso de fermentación de la leche entera UHT con gránulos de kéfir.
3. Esquemas de los procedimientos de activación, producción y acondicionamiento de los gránulos de kéfir y de la fermentación de la leche entera UHT con gránulos de kéfir.
4. Procedimientos de análisis fisicoquímicos y microbiológicos.
5. Cálculos estadísticos.
6. Clima de El Salvador según zonas térmicas.
7. Hojas de control de procesos.
8. Cociente de rechazo "Q" en el nivel de confianza del 90 %.
9. Valores críticos de la distribución  $F$ .
10. Valores críticos de la distribución  $t$ -Student
11. Valores críticos de la distribución normal estándar acumulada.
12. Certificado de análisis de proteína total y grasa realizado al producto idóneo.
13. Material y equipo.
14. Reactivos y medios de cultivo.

## INDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Pág.
1. Microbiota típica aislada de los gránulos de kéfir	32
2. Análisis sensorial de las diez leches fermentadas obtenidas a las temperaturas de ensayo durante diez fermentaciones consecutivas y del producto idóneo	75

## INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág.
1. Gránulos de kéfir	32
2. Estructura química del kefirán	37
3. Activación y producción de gránulos de kéfir a nivel de laboratorio	67
4. Acondicionamiento de los gránulos de kéfir a 25 °C, 30 °C y 35 °C	68
5. Medición de pH	71
6. Gráficos de pH por temperatura	72
7. Determinación de acidez titulable	73
8. Gráficos de acidez titulable por temperatura	74
9. Apariencia de la leche fermentada con gránulos de kéfir	75
10. Curva de distribución $F$	78
11. Graficas de medias de aumento de biomasa de los gránulos de kéfir por temperatura	83
12. Graficas de medias de pH por tiempo de fermentación	93
13. Interacción entre la temperatura y el tiempo de fermentación sobre el pH de la leche entera UHT	94
14. Recuento de hongos y levaduras del producto idóneo	97
15. Recuento de hongos y levaduras de los gránulos de kéfir	97

## INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág.
1.Parámetros microbiológicos de la leche pasteurizada y UHT	31
2.Composición nutricional de la leche entera fermentada con gránulos de kéfir por cada 100 g	38
3.Requisitos químicos de las leches fermentadas	47
4.Requisitos microbiológicos de las leches fermentadas	48
5.Porcentajes del aumento de biomasa de los gránulos de kéfir por temperatura	69
6.Porcentajes del aumento de biomasa de los gránulos de kéfir ordenados de forma ascendente	69
7. Valores de pH de la leche fermentada por temperatura	72
8. Porcentajes de acidez titulable de la leche por temperatura	73
9. Tiempo de fermentación por temperatura	76
10.Resumen estadístico para el aumento de biomasa de los gránulos de kéfir	77
11.ANOVA para aumento de biomasa de los gránulos de kéfir	79
12.Comparación múltiple de medias de aumento de biomasa de los gránulos de kéfir	80
13.Medias de aumento de biomasa por temperatura con intervalos de confianza del 95 %	81
14.Ecuaciones obtenidas de las graficas de pH por temperatura	87
15.Datos de pH por tiempo de fermentación y temperatura	87
16.ANOVA de dos factores para pH	89
17.Medias de pH con intervalos de confianza del 95 %	90
18.Comparación múltiple entre las medias de pH	92
19.Medias de pH por tiempo de fermentación	92
20.Resultados de las determinaciones fisicoquímicas realizadas al producto idóneo	95

21. Comparación de los resultados fisicoquímicos con la Norma del CODEX	95
22. Resultados de las determinaciones microbiológicas realizadas al producto idóneo	96

## ABREVIATURAS

**ANOVA** = Análisis de varianza

**AOAC** = Métodos Oficiales de Análisis

**ATP** = Adenosín trifosfato

**BAL** = Bacterias ácido lácticas

**BAM** = Manual de Análisis Bacteriológico

**CODEX** = Códice o código

**Caco2** = Células de adenocarcinoma de colón humano

**CO<sub>2</sub>** = Dióxido de carbono

**H<sub>a</sub>** = Hipótesis alternativa

**H<sub>0</sub>** = Hipótesis nula

**LSD** = Diferencia mínima significativa

**MERCOSUR** = Mercado Común del Sur

**msnm** = metros sobre el nivel del mar

**NC-TS** = Oficina Nacional de Normalización-Especificación Técnica

**OTA** = Ocratoxina A

**pKa** = Constante de disociación ácida de un ácido débil

**PSM** = Proteína de suero de leche modificada

**sp** = especie

**spp** = especies

**subsp** = subespecie

**UFC** = Unidades formadoras de colonias

**UFC/mL** = Unidades formadoras de colonias por mililitro

**UHT** = Ultra Alta Temperatura

**Var** = Variedad



## RESUMEN

La leche fermentada con gránulos de kéfir representa una fuente de nutrientes y probióticos que puede mitigar problemas como diarreas infecciosas, desnutrición y mala absorción intestinal que afectan a la población salvadoreña. Debido a esto, el objetivo de esta investigación fue estandarizar el proceso de fermentación de leche entera ultrapasteurizada con gránulos de kéfir.

Para ello se prepararon 10 leches fermentadas a 25 °C, 30 °C y 35 °C, inoculando 10.0 g de gránulos de kéfir en 100 mL de leche entera ultrapasteurizada. El tiempo de fermentación se determinó midiendo el pH inicial y luego cada dos horas; obteniendo como resultado que los tiempos en que se logró un pH entre 4.2 a 4.6 y acidez titulable entre 0.6 a 1.0%, fueron de 6, 4 y 3 horas respectivamente para cada temperatura analizada. Además, se determinó el aumento de biomasa a los gránulos de kéfir y a cada producto obtenido en las fermentaciones se les determinaron las características sensoriales.

Para seleccionar las condiciones óptimas de fermentación y conocer la dependencia del pH con respecto al tiempo y temperatura de fermentación se realizó un análisis de varianza, el cual mostró que el mayor aumento de biomasa promedio fue de  $12.55 \pm 2.28\%$  a 25 °C durante 6 horas de fermentación, siendo estas las condiciones óptimas de temperatura y tiempo. Además se determinó que el pH durante el proceso de fermentación depende del tiempo, de la temperatura y de la interacción entre estos dos factores.

El producto idóneo, obtenido en las condiciones óptimas de fermentación, presentó el 89.04% de humedad, 10.95% de sólidos totales, 0.69% de cenizas, 0.77% de acidez expresada como ácido láctico, 3.31% de grasa y 3.22% de proteína total; resultados que fueron conformes con la Norma Internacional *CODEX STAN 243-2003* Norma del *CODEX* para Leches Fermentadas. Los

resultados obtenidos en el recuento de hongos y levaduras, recuento de coliformes totales y las características sensoriales, fueron conformes a la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones, lo que garantiza un producto apto para el consumo humano.

Por lo que se recomienda que la Universidad de El Salvador, a través del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, gestione proyectos para la adquisición de gránulos de kéfir y así realizar más investigaciones sobre éstos y la leche fermentada, de tal manera que en un futuro se pueda recomendar y probablemente incluir en el sistema de alimentación de las escuelas y en las comunidades de más bajos recursos de El Salvador, por su alto contenido en bacterias probióticas y su contenido nutricional, con ayuda financiera de ONG's.

Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y en el Laboratorio Físicoquímico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud de la Universidad de El Salvador y en la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café, durante el segundo semestre del año 2011.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0. INTRODUCCION

En la actualidad las patologías originadas como es el caso de la diarrea infecciosa, generada por el consumo de alimentos contaminados por bacterias, afecta cada año hasta el 30% de la población, incluso en los países desarrollados <sup>(39)</sup>. En El Salvador, la desnutrición, enteritis y gastroenteritis afectan a la población <sup>(7, 35, 39, 46)</sup>, sobre todo a niños, manifestándose por tener bajo peso y talla <sup>(50)</sup>. Es por esto que los profesionales de la salud están reconociendo cada vez más los efectos benéficos de los probióticos sobre la salud y la nutrición humana.

La leche fermentada con gránulos de kéfir es un probiótico, aunque su contenido nutricional no difiere significativamente de la leche que se usa para su producción, su valor alimenticio es mayor, a nivel internacional se ha estudiado su efecto inhibitorio y bactericida contra bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales <sup>(18, 32)</sup>, también parámetros fisicoquímicos bajo diferentes condiciones de fermentación <sup>(2)</sup>, la composición microbiana <sup>(56)</sup> y diferentes formas de incrementar la biomasa de los gránulos de kéfir <sup>(21, 23)</sup>.

Como consecuencia de la creciente preocupación de la sociedad por una alimentación más saludable en países como Rusia, Sudáfrica y Argentina <sup>(13, 42, 56)</sup> se han estandarizado las condiciones óptimas de temperatura y tiempo para su producción. Debido a que las condiciones climáticas de cada región son diferentes, en este trabajo se estandarizó el proceso de fermentación de leche entera ultrapasteurizada (UHT) con gránulos de kéfir; para ello, se realizaron diez fermentaciones consecutivas a 25 °C, 30 °C y 35 °C, se midió el pH inicial y cada 2 horas a la leche fermentada hasta que se obtuvo un pH entre 4.2 a 4.6 y acidez titulable entre 0.6 a 1% en un tiempo de fermentación de 6, 4 y 3 horas respectivamente para cada temperatura analizada; se determinó el incremento

de biomasa de los gránulos y las características sensoriales a las leches fermentadas obtenidas de cada temperatura.

Con los resultados obtenidos se estableció la existencia de relación entre la temperatura y tiempos de fermentación sobre el pH y se establecieron las condiciones óptimas de fermentación mediante un análisis de varianza; en las cuales se elaboró un producto idóneo, a 25 °C durante 6 horas de incubación, al que se le determinó humedad, sólidos totales, cenizas, acidez, grasa y proteína total, los resultados se compararon con la Norma Internacional *CODEX STAN 243-2003* Norma del *CODEX* para Leches Fermentadas. También se le determinó recuento de hongos y levaduras, recuento de coliformes totales y las características sensoriales, los resultados se compararon con las especificaciones de la Norma Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones, lo que garantiza un producto apto para el consumo humano.

Así los resultados obtenidos de este trabajo serán de referencia para otras investigaciones sobre la leche fermentada con gránulos de kéfir, ya que en el país se carece de dicha información, y en un futuro, cuando se hayan demostrado sus propiedades y se tenga más bibliografía, pueda recomendarse al área de alimentos de el país y probablemente incluir su consumo, a nivel nacional en escuelas y comunidades de más bajos recursos con ayuda financiera de ONG's.

Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y en el Laboratorio Físicoquímico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador y en la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE), durante el segundo semestre del año 2011

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## **2.0. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Estandarizar el proceso de fermentación de leche entera ultrapasteurizada con gránulos de kéfir.

### **2.2. Objetivos Específicos**

**2.2.1.** Determinar el aumento de la biomasa de los gránulos de kéfir a 25 °C, 30 °C y 35 °C durante diez fermentaciones consecutivas.

**2.2.2.** Medir pH, acidez titulable y características sensoriales a la leche fermentada con gránulos de kéfir a 25 °C, 30 °C y 35 °C durante diez fermentaciones consecutivas.

**2.2.3.** Determinar el tiempo de fermentación y la temperatura para obtener un producto con pH y acidez titulable característicos de las leches fermentadas con gránulos de kéfir y mayor cantidad de biomasa.

**2.2.4.** Determinar al producto idóneo de fermentación acidez titulable, humedad, sólidos totales, cenizas, grasa y proteína total y comparar los resultados con la Norma Internacional *CODEX STAN 243-2003* Norma del *CODEX* para Leches Fermentadas.

**2.2.5.** Realizar las determinaciones de recuento de hongos y levaduras (UFC/g), recuento de coliformes totales (UFC/g) y las características sensoriales, al producto idóneo de fermentación, obtenido en las condiciones establecidas como óptimas para la fermentación y comparar con la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**



### 3.0. MARCO TEORICO

#### 3.1. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos, y suplementos dietéticos. Estos al administrarse en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped. Las bacterias ácido lácticas (BAL) entre las que se encuentra el género *Lactobacillus* y el especie *Bifidobacterium* que es taxónomicamente diferente a las BAL, son los usados más comúnmente como probióticos. El término probiótico debe reservarse para los microbios vivos, que han demostrado en estudios humanos controlados producir un beneficio a la salud<sup>(39, 40)</sup>.

En condiciones fisiológicas, se aconseja que la población general tome entre dos y tres raciones de lácteos al día, y la población con mayor desgaste entre tres y cuatro (deportistas, adolescentes, mujeres gestantes y en período de lactancia y ancianos), debido al aporte de nutrientes que proporcionan y a sus efectos sobre el mantenimiento del equilibrio intestinal. Por ración de lácteos se considera de 200 a 250 mL de leche, un yogur, una leche fermentada de 125 mL o un queso fresco de 60 g. Teniendo en cuenta que los microorganismos probióticos pueden tener una semivida en el interior del organismo de unas 24 horas, se puede recomendar también una ingestión mínima diaria de un yogur o probiótico, como la leche fermentada con gránulos de kéfir<sup>(49)</sup>. Este producto no puede ser consumido por niños menores de 1 año, alérgicos a la leche, enfermos inmunodeprimidos (cáncer, VIH/ SIDA, enfermedades autoinmunes) e intolerantes a la lactosa, ya que no se han realizado estudios in vivo, de los efectos que causaría ingerir la leche fermentada con gránulos de kéfir en estas personas<sup>(30)</sup>.

También se aconseja el consumo de probióticos en afecciones digestivas y diarreas, tanto por su fácil digestibilidad como por su efecto sobre el restablecimiento de la flora intestinal; en disbacteriosis intestinal debida a tratamientos con antibióticos, ya que provocan reducciones en la flora láctica intestinal colónica que puede ser restablecida mediante el consumo de probióticos.

La definición de probiótico exige el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos que integran un producto probiótico durante todo el período de su vida útil, ya que esto condicionará su efectividad.

Los productos probióticos comercializados actualmente se pueden dividir en tres tipos: a) los alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos y que se consumen, principalmente, con fines nutritivos (yogures, leche, quesos.); b) las leches cultivadas y fermentadas, utilizadas, básicamente, como vehículos de bacterias probióticas (actimel, leche acidófila.), y c) los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas (ultralevura, infloran). Los de mayor aceptación son el yogur y las leches fermentadas por constituir un buen vehículo para el aporte de un elevado número de bacterias viables y de nutrientes altamente biodisponibles.

Esto se debe, a que la viabilidad de las bacterias ácido lácticas en las leches fermentadas alcanzan valores altos entre  $10^5$ - $10^9$  UFC/mL; por el contrario, en los suplementos dietéticos éstos son reducidos entre  $10^3$  y  $10^6$  UFC/mL, limitando su potencial de efectividad. También se debe a la actividad proteolítica de las BAL, ya que degradan las proteínas de la leche en péptidos y aminoácidos libres, mejorando su asimilación por el organismo, y porque poseen los nutrientes: vitaminas (A, D, riboflavina, cianocobalamina, tiamina, piridoxina y ácido fólico) y minerales (calcio, magnesio y cinc) que contiene la leche <sup>(49)</sup>.

El contenido nutricional de la leche fermentada con gránulos de kéfir no difiere significativamente de la leche que se usa para su producción (Ver Anexo N° 1), pero su valor alimenticio es mucho mayor por el contenido de bacterias benéficas a la salud <sup>(13)</sup>.

## **3.2. Leches fermentadas**

### **3.2.1. Historia**

La fermentación de la leche es una de las prácticas más antiguas en lo que se refiere a la conservación de los alimentos <sup>(24)</sup>.

La mayoría de las leches fermentadas tiene su origen en los pueblos nómadas ganaderos de Asia, ellos la obtenían, transportando la leche fresca que ordeñaban de los animales mamíferos en sacos, generalmente de piel de cabra. El calor y el contacto de la leche con la piel de cabra propiciaban la multiplicación de las bacterias ácidas que fermentaban la leche. Así, la leche se convertía en una masa semisólida y coagulada <sup>(6)</sup>.

El origen de la leche fermentada con gránulos de kéfir se sitúa en el sudoeste asiático y en las montañas del Cáucaso, Rusia en donde sus pueblos lo vienen consumiendo de forma habitual desde hace miles de años <sup>(48)</sup>. Aunque no se tiene referencias etimológicas exactas del vocablo Kéfir, se cree que proviene de **kief**, voz turca que significa “agradable sensación”. Los musulmanes de la zona del Cáucaso creían que el Kéfir (o granos del profeta Mahoma) perdería todas sus virtudes si lo utilizaban personas de otras religiones, es por ello que fue desconocido durante mucho tiempo <sup>(59)</sup>.

Desde sus orígenes las leches fermentadas han sido ingeridas por las personas, debido a sus propiedades medicinales para el alivio de desórdenes estomacales, intestinales y del hígado. Durante la primera mitad del siglo XX,

un bacteriólogo ruso de apellido Metchnikoff relacionó la buena salud y la longevidad de los campesinos de la península de los Balcanes ubicada al sureste de Europa, con el consumo de un producto fermentado, a partir de la leche, al cual le llamaban *Yahourth* <sup>(24)</sup>.

### 3.2.2. Definiciones

Según el Codex Alimentarius la leche fermentada “es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en su composición, por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoelectrica)”. Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables <sup>(37)</sup>.

Otra definición, de leche fermentada es “aquella que ha sido transformada por el desarrollo de bacterias lácticas u otros microorganismos que transforman la lactosa en ácido láctico y otros metabolitos”. El cambio principal que se da en la leche es el descenso del pH (4.0-4.6), ya que el pH de la leche sin fermentar es de 6.6-6.8 <sup>(48)</sup>. Como consecuencia de este descenso se produce la coagulación de la caseína, que forma un gel y la inhibición del desarrollo de gran número de microorganismos, entre ellos la mayoría de los patógenos, debido a la producción de ácido láctico y otros metabolitos menores como el ácido acético, el agua oxigenada o las bacteriocinas, otro mecanismo de inhibición es un potencial de óxido-reducción bajo y el consumo por parte de las bacterias lácticas de componentes que son vitales para otros microorganismos <sup>(48)</sup>.

Además durante la fermentación se producen metabolitos como el acetaldehído y el diacetilo, que aportan aroma al producto. Algunas bacterias lácticas también producen polisacáridos que confieren a la leche fermentada una textura suave <sup>(8, 14)</sup>.

### **3.2.3. Clasificación de las leches fermentadas** <sup>(48)</sup>

Actualmente las leches fermentadas son consumidas en casi todo el mundo; existen muchas variantes, según la procedencia animal de la leche, el tipo de microorganismos que la fermentan y la tecnología utilizada.

Según el tipo de microorganismos que fermentan la leche, las leches fermentadas se clasifican en: yogurt, kumis y kéfir.

#### **3.2.3.1. Yogurt** <sup>(48)</sup>

Se entiende por yogurt o *yoghourt* al producto de leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de ***Lactobacillus bulgaricus*** y ***Streptococcus thermophilus*** a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada, con o sin adición de nata pasteurizada, leche en polvo entera, semidescremada o desnatada, suero en polvo, proteínas de leche y/u otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche.

#### **3.2.3.2. Kumis** <sup>(37, 48)</sup>

Es una bebida muy parecida a la leche fermentada con gránulos de kéfir, conteniendo la misma cantidad de ácido láctico pero mayor cantidad de alcohol (como mínimo debe contener 0.5%). El cultivo iniciador consta de ***Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus*** y ***Kluyveromyces marxianus***.

Tradicionalmente se ha elaborado con leche de yegua, aunque hoy en día se emplea normalmente la leche de vaca.

### **3.2.3.3. Leche fermentada con gránulos de Kéfir** <sup>(37, 48)</sup>

Es una leche fermentada obtenida por medio de la adición de gránulos de kéfir, estos contienen bacterias como *Lactobacillus kefir*, especies del género *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter*, también levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) como, levaduras fermentadoras sin lactosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisae* y *Saccharomyces exiguus*), que crecen en una estrecha relación específica; produciéndose durante la fermentación ácido láctico y alcohol. A diferencia del yogurt sólido este producto se bebe, ya que es líquido, efervescente y ligeramente alcohólico <sup>(6)</sup>.

## **3.3. Materias primas utilizadas en la elaboración de leche fermentada con gránulos de kéfir**

Para la elaboración de este producto, se utilizan como materia prima leche y los gránulos de kéfir que constituyen el inóculo para fermentar la leche.

### **3.3.1. Leche**

La leche es la secreción mamaria normal de animales mamíferos (vaca, cabra, oveja, entre otros), 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 <sup>(38)</sup>. En nuestra sociedad se acostumbra ingerir leche de vaca.

Para elaborar la leche fermentada con gránulos de kéfir, puede utilizarse diferentes tipos de leche, entre ellas la pasteurizada y ultrapasteurizada (UHT).

### 3.3.1.1. Leche pasteurizada <sup>(43)</sup>

Leche pasteurizada, es la leche de vaca entera, semidescremada o descremada, que ha sido sometida a un proceso de calentamiento en condiciones de temperatura y tiempo que aseguren la total destrucción de la microflora patógena y casi la totalidad de la microflora no patógena. El tratamiento térmico realizado para obtener la leche pasteurizada es de 72 a 75 °C durante 15 a 20 segundos o su equivalente (65 °C en 30 minutos).

### 3.3.1.2. Leche ultrapasteurizada (UHT) <sup>(43)</sup>

Leche ultrapasteurizada, es la leche de vaca entera, semidescremada o descremada, que ha sido sometida a un proceso de calentamiento en condiciones de temperatura y tiempo que aseguren la total destrucción de la microflora patógena y casi la totalidad de la microflora no patógena. El tratamiento térmico realizado para obtener la leche ultrapasteurizada debe ser de 135 a 140°C por un mínimo de 2 a 4 segundos o su equivalente (110 °C y 115 ° C por 4 segundos).

**Tabla N° 1.** Parámetros microbiológicos de la leche pasteurizada y UHT <sup>(43)</sup>.

Determinaciones Microbiológicas	Leche Pasteurizada	Leche Ultrapasteurizada	Leche Ultrapasteurizada envasada asépticamente <sup>(3)</sup> .
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL
Recuento total de bacterias, máximo	20000	10000	<10
Coliformes totales	Máximo 10	<1	-
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	N/A	-

La leche representa el sustrato para que los microorganismos que están en los gránulos de kéfir lo transformen en metabolitos primarios como el ácido láctico y

el ácido acético, aumentando el valor nutritivo de la leche al degradar la lactosa presente en su composición, facilitando así, su digestión y asimilación.

### 3.3.2. Gránulos de kéfir

Es una asociación de bacterias y levaduras, no patógenas, unidas por una matriz polisacárida, denominada kefirán, producida por los microorganismos que viven en estrecha simbiosis adaptándose constantemente a los cambios ambientales y manteniendo un equilibrio constante. Los gránulos de Kéfir tienen forma de masa semisólida elástica amarillenta o blanca, con una textura rugosa similar al cerebro o a la coliflor y de 20 a 30 mm de tamaño <sup>(13, 32, 57)</sup>.



Fig. N° 1. Gránulos de kéfir <sup>(52)</sup>.

Las especies de *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Cryptococcus* han sido aisladas de gránulos tradicionales <sup>(56)</sup>. También están presentes en todos los tipos de gránulos de kéfir las bacterias *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum* y los géneros *Acetobacter* y *Saccharomyces* <sup>(19)</sup>.

Cuadro N° 1. Microbiota típica aislada de los gránulos de Kéfir <sup>(32, 57)</sup>.

GENERO	ESPECIE
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i> , <i>Lb. cellobiosus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. Gasseri</i> , <i>Lb. helveticus</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> ,



**Cuadro N° 1.** Continuación.

<b>GÉNERO</b>	<b>ESPECIE</b>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Lb. parakefiri</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. viridescens</i> .
<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> .
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> var. <i>diacetyllactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .
Levaduras	<i>Cándida kefir</i> , <i>C. pseudotropicalis</i> , <i>C. tenuis</i> , <i>C. rancens</i> , <i>C. friedricchii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> var <i>lactis</i> , <i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> , <i>Issatchenkia occidentalis</i> , <i>K. bulgaricus</i> , <i>K. fragilis/marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. exiguous</i> , <i>S. lactis</i> , <i>Saccharomyces</i> subsp. <i>torulopsis holmii</i> , <i>S. turicensis</i> sp. nov, <i>S. unisporus</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Yarrownia lipolytica</i> , <i>Zygosaccharomyces florentinus</i> .
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus durans</i> .
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> .
<i>Acetobacterias</i>	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>A. rasens</i> .

#### **2.4. Métodos utilizados para la elaboración de leche fermentada con gránulos de kéfir**

Los métodos actualmente disponibles para la producción de leche fermentada con gránulos de kéfir son <sup>(6)</sup>:

- El método tradicional basado.
- El método ruso.
- El método industrial mediante la inoculación directo a cuba (IDC).

##### **3.4.1. Método tradicional <sup>(10)</sup>**

El método tradicional o artesanal consiste en la adición de gránulos de kéfir en una proporción del 2% al 10% p/v en leche pasteurizada. Durante un período de fermentación aproximadamente de 24 horas, a temperatura ambiente. Si la

fermentación se hace por un período de 24 a 36 horas, se obtiene una leche ácida suavemente laxante; y si es durante 36 a 48 horas, el producto es aun más ácido y astringente para algunas personas mientras que para otras es un buen regulador intestinal.

La leche fermentada, obtenida contiene la misma microflora presente en el gránulo de kéfir. Está lista para el consumo, y puede adicionársele azúcar para disminuir su sabor ácido. Los gránulos de kéfir crecen en el proceso de fermentación, se separan de la leche fermentada por filtración y pueden utilizarse para realizar una nueva fermentación inoculándolos en una proporción del 2% al 10% p/v, en nueva leche pasteurizada.

En los casos en que los gránulos produzcan una fermentación poco ácida y de mal aspecto y olor, es muy aconsejable hervir la leche o cambiar los gránulos de kéfir (ya que estos podrían estar muriendo) y empezar de nuevo, otra fermentación para evitar posibles contaminaciones.

#### **3.4.2. Método ruso** (10, 33)

Permite la producción de la leche fermentada con gránulos de kéfir a mayor escala utilizando dos fermentaciones en serie. El primer paso es preparar los cultivos mediante la incubación de la leche pasteurizada con gránulos en una proporción del 2% al 3% p/v durante 24 horas entre una temperatura de 15 °C a 20 °C, después de 24 horas los gránulos se separan por filtración y el cultivo madre resultante se añade a nueva leche en una proporción del 1% al 3% p/v, que se fermenta durante 12 a 18 horas.

#### **3.4.3. Método industrial**

Este proceso se realiza mediante la inoculación directa a cuba, empleando los gránulos de kéfir como cultivo iniciador. Los gránulos se inoculan en leche

descremada pasteurizada e incuban a 25 °C durante 1 a 2 días. Luego se separan de la leche fermentada y se utilizan para realizar nuevamente el cultivo iniciador. La leche fermentada obtenida se inocula al 5% p/v en leche entera pasteurizada durante un período de fermentación de 12 horas a una temperatura de 18 °C a 22 °C, después, esta leche se deja fermentando durante 1 a 3 días a una temperatura de 10 °C antes de ser comercializada <sup>(5, 53)</sup>.

### **3.5. Utensilios empleados en la elaboración de leche fermentada con gránulos de kéfir** <sup>(57, 58)</sup>

Para obtener la leche fermentada con gránulos de kéfir, bajo un método artesanal de elaboración se utiliza los siguientes utensilios:

- Un recipiente higiénico, de plástico o preferentemente de vidrio, totalmente transparente. Si el recipiente es de barro, debe estar libre de metales usados para el esmaltado al horno. La capacidad ha de ser mayor que el volumen de leche fermentada con gránulos de kéfir que se prepare. Esto es importante sobre todo si se hace la fermentación con el recipiente cerrado a presión en cuyo caso ha de quedar 1/3 de aire.
- Una tapa, que evite el contacto directo con el aire. Puede ser un paño de tela sostenido con un cordel o banda elástica para sujetarlo o una tapa que ajuste bien de vidrio o madera.
- Un colador, para separar los gránulos. Se recomienda que sean elaborados de plástico blanco, junco o de bambú, etc.
- Un tenedor de madera o un cucharón para recoger los gránulos.

Los utensilios empleados en el proceso de fermentación de la leche no deben de ser metálicos porque el pH ácido que se obtiene al final de la fermentación puede reaccionar con sus componentes y formar compuestos nocivos para la salud.

### **3.6. Características fisicoquímicas de la leche fermentada con gránulos de kéfir** (13, 32, 55, 57, 58)

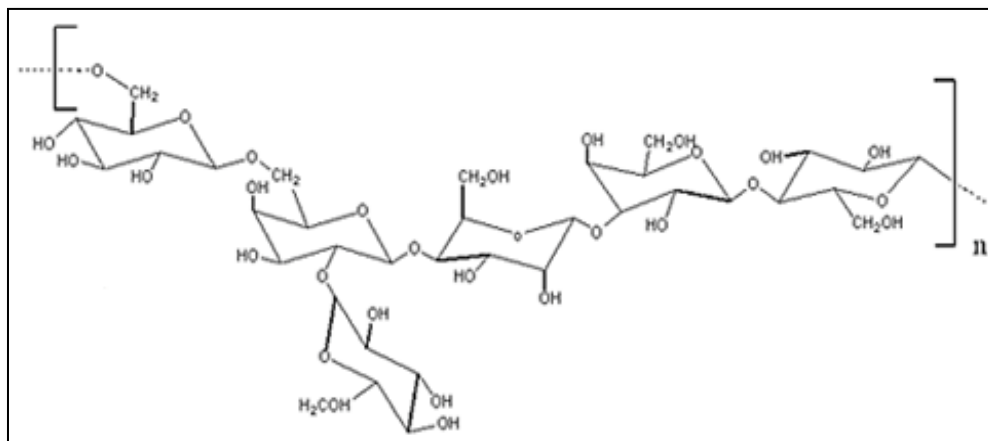
La leche fermentada con gránulos de kéfir es una bebida refrescante, presenta burbujas debido al CO<sub>2</sub>, con sabor ligeramente ácido o agrio, con un suave aroma similar a la levadura fresca.

Contiene 0.03% a 1.8% de alcohol, además de compuestos aromáticos como el acetaldehído y el diacetilo que contribuyen a su sabor único y aroma agradable, especial de este tipo de leche fermentada.

Presenta una consistencia más fluida que el yogurt. Esto quiere decir que la cuajada que se forma cuando se fermenta la leche se fragmenta muy fácilmente en partículas muy pequeñas, mientras que el cuajo del yogurt se mantiene cohesionado, o se deshace en pedazos, facilitando su digestión, por presentar una mayor superficie de contacto.

El polisacárido en donde se agrupan los microorganismos es un polímero ramificado moderadamente regular, su unidad de repetición consiste en tres moléculas de glucosa y tres de galactosa, (ver Fig. N°2), es soluble en agua y tiene textura viscosa.

La leche fermentada con gránulos de kéfir contiene 0.2 a 0.7% del kefirán producido por los gránulos de kéfir, durante el proceso de fermentación. Cuando se ingiere la leche fermentada, al llegar a los intestinos, permite la colonización de bacterias beneficiosas en la flora intestinal.



**Fig. N° 2.** Estructura química de kefirán <sup>(60)</sup>.

Usando menos proporción de leche durante la fermentación, esta sustancia puede estar más concentrada en el producto final, este componente junto a las levaduras contribuyen a la particular textura única, rica y cremosa de la leche fermentada con gránulos de kéfir.

En el intercambio entre la leche y los gránulos de kéfir se produce una doble fermentación en la que se transforman los azúcares y proteínas de la leche en:

- CO<sub>2</sub> y Etanol, producido por el metabolismo de las levaduras y BAL heterofermentativas.
- Ácido acético; muchos *Lactobacillus* producen diacetilo.
- Ácido láctico; producido por el metabolismo de las BAL, que reducen y transforman la lactosa (el azúcar de la leche), en ácido láctico, responsable de su acidez (pH de 4.2 a 4.6).
- Proteínas coaguladas. Transforma la caseína y la albúmina.

### 3.7. Composición de la leche fermentada con gránulos de kéfir <sup>(14)</sup>

La composición de la leche fermentada con gránulos de kéfir depende en gran medida del tipo de leche que se fermenta. Sin embargo, durante la fermentación, se ha demostrado que se producen cambios en la composición

de proteínas, vitaminas, carbohidratos, sales minerales y otros componentes. El ácido L (+) láctico es el ácido orgánico en mayor concentración después de la fermentación y se deriva de aproximadamente el 25% de la lactosa original del volumen inicial de leche. Los aminoácidos valina, leucina, lisina y serina se forman durante la fermentación, mientras que las cantidades de alanina y ácido aspártico aumentan en comparación con las que contiene la leche cruda. También hay presencia de ácido acético. Estudios muestran que cantidades apreciables de piridoxina, vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico y biotina se sintetizaron en la producción de kéfir, dependiendo del país de donde provengan los gránulos de kéfir utilizado, mientras que la tiamina y los niveles de riboflavina se redujeron.

En el cuadro N° 3, se muestran otros componentes que posee la leche fermentada con gránulos de kéfir. (Ver anexo N° 1)

**Tabla N° 2.** Composición nutricional de la leche entera fermentada con gránulos de kéfir por cada 100 g <sup>(58)</sup>.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Kcal.	61	Magnesio (mg)	12
Proteínas (g)	3.3	Hierro (mg)	0.1
Lípidos (g)	3.5	Vit. A (mg)	31
Glúcidos (g)	4	Vit. E (mg)	0.2
Agua (g)	87.5	Vit. B1 (mg)	0.03
Colesterol (mg)	11	Vit. B2 (mg)	0.18
Sodio (mg)	48	Vit. B3 (mg)	0.1
Potasio (mg)	157	Vit. B6 (mg)	31
Calcio (mg)	120	Vit. C (mg)	0.2
Fosforo (mg)	92	Potasio (mg)	157

### **3.8. Propiedades de los metabolitos producidos durante la fermentación y de la leche fermentada con gránulos de kéfir**

Entre algunas de las propiedades que presentan los gránulos de kéfir y la leche fermentada con gránulos de kéfir se encuentran: la actividad probiótica, actividad antimicrobiana y cicatrizante de un medio de cultivo fermentado con gránulos de kéfir y del kefirán, actividad antimicrobiana del ácido acético, efecto de desintoxicación o eliminación de ocratoxina A en alimentos por BAL.

#### **3.8.1. Actividad probiótica** (13, 14)

Los probióticos afectan el ecosistema intestinal estimulando los mecanismos inmunitarios de la mucosa y estimulando los mecanismos no inmunitarios a través de un antagonismo/competencia con los patógenos potenciales.

En un ensayo de alimentación a largo plazo se estudio el perfil microbiológico de los ratones y se encontró que el recuento de BAL aumentó en el intestino delgado y el intestino grueso, mientras que el conteo de enterobacterias y clostridios disminuyó. En humanos se realizó el mismo ensayo y se comparó la materia fecal de los sujetos que consumieron leche fermentada con gránulos de kéfir de tipo húngaro-ruso y una leche fermentada que se elaboró añadiendo BAL a la leche fermentada con gránulos de kéfir de origen ruso. Este estudio mostró que el número total de bacterias en la materia fecal y el número de ciertas bacterias probióticas específicas para ambos grupos aumentó después de cuatro semanas de consumo (0,5 L/día). Esto plantea la posibilidad de que el kéfir o uno de sus componentes puede ser un prebiótico.

La cantidad de microorganismos presentes en la leche fermentada con gránulos de kéfir (mayor de  $10^7$  UFC/g) es suficiente para ser considerado un probiótico. Un estudio científico informó que varias cepas de *Lactobacillus spp* aislados de la leche fermentada con gránulos de kéfir de varios países tienen una buena

adhesión a células Caco-2, fueron resistentes a pH bajo y al ácido biliar, también presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias enteropatógenas comunes, estos son criterios exigidos para ser consideradas bacterias probióticas.

### 3.8.2. Actividad antimicrobiana y cicatrizante de un medio de cultivo fermentado con gránulos de kéfir y del kefirán <sup>(29)</sup>

Se afirma que la leche fermentada con gránulos de kéfir actúa en contra de los patógenos ***Salmonella***, ***Helicobacter***, ***Shigella***, ***Staphylococcus***, y ***Escherichia coli*** y que también posee actividad antiinflamatoria. Estas dos propiedades pueden ser de utilidad como un tratamiento alternativo para suministrarlo en hospitales a pacientes infectados con una sola o cepas multi-resistentes en bacteremias nosocomiales.

Por lo tanto, se han evaluado la actividad cicatrizante de un gel elaborado con 70% de gránulos de kéfir y la actividad antimicrobiana que posee un medio de cultivo constituido por melazas, fermentado con gránulos de kéfir y el polisacárido soluble kefirán, contra ***Staphylococcus aureus***, ***Streptococcus salivarius***, ***Streptococcus pyogenes***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Candida albicans***, ***Salmonella typhimurium***, ***Listeria monocytogenes***, ***E. coli*** y ***Candida albicans*** todas cepas ATCC; utilizando un método de difusión en agar y comparando su efectividad con antimicrobianos.

La actividad cicatrizante se evaluó en ratas con lesiones de la piel inducida por la inoculación de ***Staphylococcus aureus***, con una aplicación tópica de un gel elaborado con un 70% de gránulos de kéfir. Los experimentos cicatrizantes tuvieron un efecto protector sobre el tejido conectivo y la piel durante 7 días de tratamiento, teniendo mayor curación de la herida en comparación con 5 mg/kg de emulsión de neomicina-clostebol.



Los antibióticos, el medio de cultivo fermentado con gránulos de kéfir durante 24 horas y extractos purificados de kefirán se pipetearon en discos de papel de 5 mm de diámetro con diferentes concentraciones de ceftriaxona, ampicilina, azitromicina, oxacilina y ketoconazol. Las placas inoculadas se incubaron a 35.5 °C durante 24 horas por triplicado, y las zonas de inhibición se midieron usando un pakimeter analítico. Tanto el medio de cultivo fermentado con gránulos de kéfir y el kefirán mostraron alguna actividad contra todos los organismos en cuestión; la mayor actividad fue contra ***Streptococcus pyogenes***.

### **3.8.3. Actividad antimicrobiana del ácido acético producido durante la fermentación de la leche con gránulos de kéfir <sup>(11)</sup>**

El ácido acético y sus sales son ampliamente utilizados en los alimentos como acidulantes y antimicrobianos. La actividad del ácido acético varía en función de los productos alimenticios, el medio ambiente y el microorganismo. Esto es debido a su solubilidad, sabor y baja toxicidad. Muchos factores influyen en la eficacia de los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos, incluyendo la hidrofobicidad. Sin embargo, el uso de ácidos orgánicos generalmente está limitado por los alimentos con pH menor de 5, ya que la mayoría tiene un pKa en el rango de 3 a 5.

Los ácidos orgánicos actúan a nivel de la membrana citoplasmática de las células. La forma no dissociada del ácido orgánico la cual es permeable a la membrana celular permite que se difunda al interior de la célula. Una vez dentro de la célula la molécula de ácido se disocia en un anión y un protón debido al pH intracelular más alcalino que alcanza valores de 7.4 a 7.6 a diferencia del pH exterior que es ácido, medio que propicia el crecimiento de algunas bacterias patógenas. Puesto que las bacterias deben ser capaces de mantener un pH interno, cerca de la neutralidad, los protones generados de la disociación del

ácido orgánico deben ser sacados al exterior de la célula, para ello la célula necesita energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), habiendo un flujo constante de protones con el tiempo se agotará la energía celular.

La función antimicrobiana del ácido acético a pH 6, se observó en ***Bacillus***, ***Clostridium***, y bacterias gram negativas ya que fueron inhibidos más que las bacterias ácido lácticas, levaduras, mohos y otras bacterias gram positivas.

A pH 5, las bacterias gram positivas son más inhibidas que las bacterias del ácido láctico, levaduras y mohos. A pH 4, la concentración de ácido acético requerido para la inhibición fue reducida considerablemente.

El ácido acético y sus sales han mostrado resultados variables como agentes antimicrobianos en aplicaciones alimentarias y por presentar efecto antimicrobiano contribuye a la conservación de la leche fermentada con gránulos de kéfir.

#### **3.8.4. Efecto de desintoxicación o eliminación de Ocratoxina A (OTA) en alimentos por BAL <sup>(1, 54)</sup>**

La OTA es una de las micotoxinas más importantes ya que se ha demostrado que sus propiedades son tóxicas, siendo principalmente conocida por su nefrotoxicidad y carcinogenicidad en especies animales. La OTA es producida por varias especies de ***Aspergillus*** y ***Penicillium*** que se pueden encontrar en una amplia variedad de productos agrícolas, lo que hace que su presencia en estos productos sea común.

Se han investigado varios procesos de remediación para eliminar, reducir o evitar los efectos tóxicos de OTA <sup>(1)</sup>. Estas estrategias se pueden clasificar en tres categorías principales: prevención de la contaminación de OTA, la

descontaminación o detoxificación de alimentos contaminados con OTA (por medio de métodos físicos, fisicoquímicos, químicos y microbiológicos), y la inhibición de la absorción de OTA en el tracto gastrointestinal. Siendo las medidas preventivas las más importantes que deben adoptarse para el control y para evitar la proliferación de OTA. Los métodos microbiológicos se han considerado cada vez más como una alternativa a los tratamientos físicos y químicos; y utilizan microorganismos, que pueden descomponer, transformar o absorber OTA para desintoxicar los productos contaminados o para evitar los efectos tóxicos de las micotoxinas. Las bacterias ***Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus***, ***Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*** y ***Bifidobacterium bifidum*** pueden eliminar OTA presente en muestras de leche con 0.05 y 0.1 mg de OTA/L.

En la actualidad se acepta generalmente que la adsorción de la OTA a las paredes de las células es el mecanismo de desintoxicación, fenómeno predominante en las que participan las BAL <sup>(1)</sup>. Por ello podría utilizarse a futuro la leche fermentada con gránulos de kéfir como un tratamiento para eliminar OTA en el tracto gastrointestinal, ya que contiene BAL.

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

Los gránulos de kéfir se pueden conservar congelados, secos o húmedos <sup>(20)</sup>.

Los diferentes procedimientos se describen a continuación:

- Conservación de los gránulos de kéfir húmedos: se sumergen en leche y se almacenan en refrigeración a 4 °C, de esta manera mantienen su actividad de 8 a 10 días <sup>(20)</sup>.
- Conservación de los gránulos de kéfir secos: pueden utilizarse los métodos de secado térmico al vacío, convencional o convectivo, siendo el método convectivo el más recomendable, ya que al realizar fermentaciones en suero

de leche a partir de gránulos de kéfir secados por éste método dan como resultado mayor concentración de ácido láctico y etanol <sup>(41)</sup>.

También pueden secarse los gránulos, a temperatura ambiente, durante 36 a 48 horas, de esta manera, mantienen su actividad por 12 a 18 meses <sup>(20)</sup>.

- Conservación de los gránulos de kéfir congelados: se conservan a - 20 °C o - 80 °C, esta forma de conservación es mejor respecto a la conservación húmeda, ya que se ha demostrado un mayor aumento en el peso del gránulo después de sucesivas fermentaciones <sup>(17)</sup>.

### **3.10. Conservación de la leche fermentada con gránulos de kéfir** <sup>(13, 45)</sup>

Las leches fermentadas deberán ser envasadas en materiales adecuados como botellas de vidrio con tapón plástico o envases de polietileno de alta densidad con tapas de aluminio recubiertas de plástico, para las condiciones de almacenamiento previstas (refrigeración) y que confieran al producto una protección adecuada y deberán conservarse y comercializarse a una temperatura no superior a 10 °C.

### **3.11. Control de calidad de las leches fermentadas** <sup>(9)</sup>

Las entidades reguladoras en cada país están encargadas de proteger la salud de los consumidores y establecer normas que rigen a los comerciantes y empresas productores de alimentos que garanticen la inocuidad de los productos de consumo humano, con lo que respecta al análisis microbiológico e higiene.

En El Salvador no hay una norma específica para leches fermentadas, pero la Norma del *CODEX* para Leches Fermentadas *CODEX STAN 243-2003*, el Reglamento técnico MERCOSUR de identidad y calidad de leches fermentadas y la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-

especificaciones, todas para leches fermentadas, establecen parámetros que se toman de referencia para investigaciones científicas.

### **3.11.1. Control sanitario** <sup>(9)</sup>

Hay que tener en cuenta las posibles fuentes de contaminación del medio ambiente. En particular, la producción primaria de alimentos no deberá llevarse a cabo en zonas donde la presencia de sustancias posiblemente peligrosas conduzca a un nivel inaceptable de tales sustancias en los productos alimenticios. Para la producción de la leche fermentada con gránulos de kéfir, deberá utilizarse utensilios limpios; en nuestro trabajo se hizo uso de estériles.

### **3.11.2. Requisitos de calidad de leches fermentadas** <sup>(37)</sup>

Aplica a las leches fermentadas, incluyendo las leches fermentadas tratadas térmicamente, las leches fermentadas concentradas y los productos lácteos compuestos basados en estos productos, para consumo directo o procesamiento ulterior.

#### **3.11.2.1. Requisitos generales de leches fermentadas** <sup>(37)</sup>

Materias primas:

- Leche y/o productos obtenidos a partir de la leche.
- Agua potable para usar en la reconstitución o recombinación.

Ingredientes permitidos:

- Cultivos de microorganismos inócuos.
- Otros microorganismos aptos e inócuos (bebidas a base de leche fermentada).
- Cloruro de Sodio.
- Ingredientes no lácteos (leches fermentadas aromatizadas).
- Agua potable (bebidas a base de leche fermentada).

- Leche y productos lácteos (bebidas a base de leche fermentada).
- Gelatina y almidón en leches fermentadas tratadas térmicamente luego de la fermentación, leche fermentada aromatizada, bebidas a base de leche fermentada y leches fermentadas simples; siempre y cuando se agreguen solamente en cantidades funcionalmente necesarias de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación, y tomando en cuenta todo uso de estabilizantes/espesantes. Estas sustancias podrán añadirse antes o después del agregado de los ingredientes no lácteos.

### **3.11.2.2. Características sensoriales** <sup>(27)</sup>

Aspecto: color uniforme. Blanco si es natural. En la leche aromatizada el color será típico al sabor que representa. Homogéneo.

Olor: típico a producto lácteo fermentado. En la leche fermentada aromatizada, típico al aromatizante natural o artificial y a producto lácteo fermentado.

Sabor: típico a producto lácteo fermentado. En la leche fermentada aromatizada, típico al aromatizante natural o artificial y a producto lácteo fermentado. Acidez de muy ligera a moderada en dependencia del tipo de leche fermentada. Dulzor de muy ligero a moderado en dependencia del tipo de leche fermentada.

Textura: consistencia viscosa. Cremosa. La leche fermentada coagulada en el envase presentará coágulo firme. Grumosidad de ligera a moderada en dependencia del tipo de leche fermentada.

### 3.11.2.3. Requisitos químicos de acuerdo a la Norma del CODEX para Leches Fermentadas CODEX STAN 243-2003

**Tabla N° 3.** Requisitos químicos de las leches fermentadas <sup>(37)</sup>.

Requisito químico	Leche fermentada con gránulos de Kéfir
Proteína láctea <sup>a,b</sup>	Min. 2.7%
Grasa (%p/p). En leche entera	<10%
Acidez valorable expresada como % de ácido láctico (%p/p)	Min. 0.60%
Suma de microorganismos <sup>c</sup> (UFC/g, en total)	Min. 10 <sup>7</sup>
Levaduras (UFC/g)	Min. 10 <sup>4</sup>

- a) El contenido en proteína es 6.38 multiplicado por el nitrógeno Kjeldahl total determinado.
- b) La determinación de proteína se verificará en el producto terminado periódicamente.
- c) Cultivo preparado a partir de gránulos de kefir, *Lactobacillus kefir*, especies del género *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter* que crecen en una estrecha relación específica.

Los gránulos de kéfir constituyen tanto levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) como levaduras fermentadoras sin lactosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisae* y *Saccharomyces exiguus*).

### 3.11.2.4. Requisitos microbiológicos de acuerdo con la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones

**Tabla N° 4.** Requisitos Microbiológicos de las Leches Fermentadas <sup>(27)</sup>.

Requisitos microbiológicos	Leche fermentada con gránulos de Kéfir
Recuento de hongos	Max. $\leq$ 100 UFC/g
Recuento de levaduras	Min. $10^4$ UFC/g
Recuento de coliformes totales	Max. $\leq$ 100 UFC/g

### 3.11.3. Características esenciales de elaboración <sup>(45)</sup>

No está permitido retirar el suero luego de la fermentación en la elaboración de leches fermentadas, salvo para la Leche Fermentada Concentrada.



**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## 4.0. DISEÑO METODOLOGICO

### 4.1. Tipo de estudio

**4.1.1. Prospectivo:** debido a que los datos obtenidos de la investigación podrán tomarse como una referencia para otros trabajos de graduación sobre las propiedades probióticas de la leche fermentada con gránulos de kéfir, así en un futuro, cuando se hayan demostrado estas propiedades, pueda incluirse el consumo de este alimento, elaborado artesanalmente, a nivel nacional en escuelas y comunidades de más bajos recursos con ayuda financiera de ONG's.

**4.1.2. Experimental:** para estandarizar el proceso de fermentación se realizaron a tres temperaturas diferentes diez fermentaciones consecutivas, determinación de las características sensoriales, medición de pH y determinación de acidez titulable a cada leche fermentada; se efectuó el análisis fisicoquímico y microbiológico a las leches fermentadas obtenidas bajo las condiciones óptimas de fermentación, en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y en el Laboratorio Fisicoquímico, ambos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador y en la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE).

### 4.2. Investigación bibliográfica

Se investigó en las siguientes bibliotecas:

- “Dr. Benjamín Orozco” Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Ingenierías de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca virtual de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM).
- Internet.

### 4.3. Investigación de campo

Se estandarizó el proceso de fermentación preparando 30 leches fermentadas, las cuales fueron obtenidas durante diez fermentaciones consecutivas, diez leches fermentadas obtenidas a  $25 \pm 1$  °C, diez a  $30 \pm 1$  °C y diez a  $35 \pm 1$  °C (Ver anexo N° 2), se estableció para cada temperatura el tiempo en horas en que se logra la fermentación de la leche entera UHT, que se evidenció por presentar un pH entre 4.2 a 4.6 y una acidez titulable de 0.6 % a 1 % expresada en términos de ácido láctico. La medición del pH se realizó cada dos horas, se tituló la leche fermentada obtenida al final de la fermentación y se determinó sus características sensoriales.

Se realizó un muestreo dirigido puntual, al producto idóneo que se elaboró por triplicado, éste se hizo en las condiciones óptimas de fermentación (que se establecieron con los resultados obtenidos), que son pH de 4.2 a 4.6 y acidez titulable de 0.6 % a 1 % expresada en términos de ácido láctico.

### 4.4. Parte Experimental

#### 4.4.1. Activación y producción de los gránulos de kéfir a nivel de laboratorio <sup>(19, 21)</sup>

Los gránulos de kéfir identificados como KVG-ES10 originarios de Marruecos\* se descongelaron a temperatura ambiente, y posteriormente se realizó el siguiente procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 3):

- Se colocaron los gránulos de kéfir en un tamiz plástico, se lavaron con 25 mL de agua desmineralizada estéril, se escurrieron y se les determinó la biomasa inicial.

---

\* MSc. Verónica Carmelina Díaz Avilés, Docente Directora de Trabajo de Graduación, proporcionó los gránulos de kéfir

- Se inocularon los gránulos de kéfir en leche entera UHT en una relación 1:10 en un vaso de precipitado de capacidad adecuada.
- Se midió el pH a la preparación, se tapó el vaso de precipitado con papel parafilm e incubó a  $25 \pm 1$  °C durante 8 horas.
- Posteriormente se separaron los gránulos de kéfir de la leche fermentada con ayuda de un tamiz plástico, se lavaron con 25 mL de agua desmineralizada estéril, se escurrieron y se les determinó la biomasa final.
- Se midió el pH y se determinó la acidez titulable a la leche fermentada.
- Los gránulos obtenidos se inocularon en un nuevo volumen de leche y se midió el pH e incubó la preparación a  $25 \pm 1$  °C, durante 14 horas.
- El procedimiento descrito anteriormente se realizó las veces necesarias hasta obtener una cantidad suficiente de gránulos de kéfir para realizar los procesos descritos a partir del numeral 4.4.2.

En la tabla N° 24 se especifica el control en proceso que se llevó durante la activación y producción de gránulos de kéfir a nivel de laboratorio (Ver anexo N° 7).

#### **4.4.2. Acondicionamiento de los gránulos de kéfir a 25°C, 30 °C y 35 °C**

La biomasa de los gránulos de kéfir obtenidos en el numeral 4.4.1. se dividió en tres porciones de igual peso y se realizó el siguiente procedimiento para cada porción de gránulos (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 3):

- Se colocaron los gránulos de kéfir en un tamiz plástico, se lavaron con 25 mL de agua desmineralizada estéril, se escurrieron y se les determinó la biomasa inicial.
- Se inocularon los gránulos de kéfir por separado en leche entera UHT, en una relación 1:10, en vasos de precipitado de capacidad adecuada.

- Se midió el pH a cada preparación, se taparon los vasos de precipitado con papel parafilm e incubaron (una preparación a  $25 \pm 1$  °C, otra a  $30 \pm 1$  °C y otra a  $35 \pm 1$  °C), durante 8 horas.
- Posteriormente se separaron los gránulos de kéfir de la leche fermentada de cada preparación con ayuda de un tamiz plástico, se lavaron con 25 mL de agua desmineralizada estéril, se escurrieron y se les determinó la biomasa final.
- Se midió el pH y se determinó la acidez titulable a la leche fermentada obtenida de cada preparación.
- Los gránulos obtenidos en cada temperatura de ensayo se inocularon en un nuevo volumen de leche y se midió el pH e incubaron a la temperatura correspondiente durante 14 horas.
- Se realizó el procedimiento descrito anteriormente dos veces consecutivas.
- En la tabla N° 24 se especifica el control en proceso que se llevó durante el acondicionamiento de los gránulos de kéfir a las diferentes temperaturas (Ver anexo N° 7).

Nota: en los casos que sea necesario interrumpir las fermentaciones consecutivas, los gránulos de kéfir serán almacenados en un vaso de precipitado de capacidad adecuada, sumergidos en un nuevo volumen (el necesario para cubrir los gránulos) de leche entera UHT, debidamente rotulados a la temperatura de fermentación que corresponda, y se refrigeran a 4 °C.

#### **4.4.3. Fermentación de la leche entera ultrapasteurizada con los gránulos de kéfir a 25 °C, 30 °C y 35 °C**

Se pesaron 10.0 g de gránulos de kéfir obtenidos a cada temperatura de ensayo del numeral 4.4.2. y se realizaron diez fermentaciones consecutivas.

Procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 3):

- Se inocularon 10.0 g de gránulos de kéfir en 100 mL de leche entera UHT, (relación 1:10), en vasos de precipitado de capacidad adecuada.
- Se midió el pH inicial, se taparon los vasos de precipitado con papel parafilm e incubaron cada preparación a las temperaturas de ensayo.
- Luego se midió el pH de cada preparación cada 2 horas y se detuvo el proceso de fermentación hasta obtener un pH de 4.2 a 4.6, este periodo duro 6 horas a 25 °C, 4 horas a 30 °C y 3 horas a 35 °C.
- Posteriormente se separaron los gránulos de kéfir de la leche fermentada con ayuda de un tamiz plástico, se lavaron con 25 mL de agua desmineralizada estéril, se escurrieron y se les determinó la biomasa final.
- Se determinaron las características sensoriales, pH y acidez titulable a la leche fermentada obtenida de cada preparación.
- Luego se almacenaron los gránulos de kéfir en un vaso de precipitado de capacidad adecuada, sumergidos en un nuevo volumen de leche entera UHT debidamente rotulados a la temperatura de fermentación que corresponda y se refrigeraron a 4 °C hasta el día siguiente que iniciaba una nueva fermentación.

En la tabla N° 25 se especifica el control en proceso que se llevó durante las fermentaciones de leche entera UHT con gránulos de kéfir a las diferentes temperaturas (Ver anexo N° 7).

#### **4.4.4. Selección de las condiciones óptimas de fermentación**

Con los resultados obtenidos en el numeral 4.4.3., se determinó la temperatura de incubación que produjo el mayor aumento de biomasa de los gránulos de kéfir durante la fermentación de la leche entera UHT, con un pH entre 4.2 a 4.6, acidez titulable y características sensoriales, propios de las leches fermentadas con gránulos de kéfir. Después de establecer las condiciones óptimas de fermentación, se elaboró un producto idóneo por triplicado, bajo estas

condiciones, y se le realizó un análisis fisicoquímico y microbiológico. En la tabla N° 26 se especifica el control en proceso que se llevó durante la fermentación del producto idóneo (Ver anexo N° 7).

#### **4.4.5. Determinaciones fisicoquímicas realizadas durante el proceso de fermentación y análisis del producto idóneo**

##### **- Determinación de biomasa <sup>(21)</sup>**

Se determinó la biomasa de los gránulos de kéfir al inicio y al final de cada proceso de fermentación, por el método gravimétrico propuesto por Goršek A. y Tramšek M.

Procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 4):

- Se lavaron los gránulos de kéfir con agua desmineralizada estéril.
- Se escurrieron en un tamiz plástico y se pesaron en una balanza analítica.

##### **- Medición de pH**

Se midió el pH al inicio, cada 2 horas y al final de cada proceso de fermentación, se detuvo la fermentación hasta alcanzar un pH de 4.2 a 4.6. Este período duro 6 horas a 25 °C, 4 horas a 30 °C y 3 horas a 35 °C, durante diez fermentaciones consecutivas y en la preparación del producto idóneo utilizando un pH-metro.

Procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 4):

- Se calibró el pH-metro (con compensación automática de temperatura utilizando una sonda CAT) con buffer pH 4 y buffer pH 7.
- Se midió el pH sumergiendo el electrodo directamente en cada preparación.

Nota: previo a cada medición debe agitarse la preparación y la leche fermentada utilizando un agitador de vidrio estéril para lograr una medición más estable y homogénea.

#### - **Acidez titulable** <sup>(25)</sup>

Se determinó el porcentaje de acidez, a la leche fermentada obtenida en cada proceso de fermentación y al producto idóneo obtenido en las condiciones óptimas de fermentación, por el Método titrimétrico de la AOAC Official Method 947.05 modificado.

Procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 4):

- Se pesaron 10.0 g de muestra (leche fermentada) en un erlenmeyer de 50 mL y se diluyó al doble del volumen usando agua desmineralizada libre de CO<sub>2</sub>.
- Se añadieron 3 gotas de fenolftaleína, se agitó y se valoró con solución de NaOH 0.1 N hasta que el primer color rosa fuera persistente.
- Las valoraciones se realizaron por duplicado y se reportó la acidez como porcentaje de ácido láctico por peso utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Acidez total} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N} \times 0.09}{\text{g de muestra}} \times 100$$

Dónde:

N = Normalidad del hidróxido de sodio.

0.09 = Miliequivalentes del ácido láctico.

#### - **Características sensoriales** <sup>(27)</sup>

Se le determinaron las características sensoriales de aspecto, olor, sabor, y textura, que establece la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones, a las leches fermentadas obtenidas a las tres temperaturas de ensayo durante diez fermentaciones consecutivas y al



producto idóneo obtenido en las condiciones óptimas de fermentación. En el cuadro N° 5, se especifica el control en proceso que se llevó durante esta determinación. (Ver anexo N° 7).

#### 4.4.6. Determinaciones fisicoquímicas

Al producto idóneo que se elaboró por triplicado, se le determinó las características sensoriales y las siguientes determinaciones fisicoquímicas:

##### - **Humedad** <sup>(25)</sup>

Se determinó el porcentaje de humedad por el método gravimétrico de la AOAC 7.003 y 930.15 modificado.

Procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 4):

- Se calentó la estufa a  $135 \pm 2$  °C y se colocaron dos contenedores destapados y sus tapas a esa temperatura durante 1 hora.
- Se trasladaron los contenedores destapados y sus tapas al desecador empleando pinzas, se dejaron enfriar durante 30 minutos y se pesaron con sus tapas en una balanza analítica.
- Se pesó aproximadamente 2.0 g de muestra por duplicado en su respectivo recipiente en balanza analítica, se colocaron las muestras en la estufa lo más rápidamente posible, los contenedores destapados y sus tapas, a  $135 \pm 2$  °C durante 2 horas.
- Empleando pinzas, se trasladaron los contenedores destapados al desecador, se dejaron enfriar y luego se pesaron.
- Se calculó la pérdida de peso como humedad utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Dónde:

$m_1$  = Peso del contenedor vacío y de su tapa, en gramos.

$m_2$  = Peso del contenedor tapado con la muestra antes del secado, en gramos.

$m_3$  = Peso del contenedor con la tapa más la muestra desecada, en gramos.

#### - **Sólidos totales** <sup>(28)</sup>

Se determinó el porcentaje de sólidos totales a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Sólidos totales} = 100 - \% \text{ Humedad}$$

#### - **Cenizas** <sup>(12, 25)</sup>

Se determinó el porcentaje de cenizas por el Método gravimétrico de la AOAC Official Method 945.46 modificado, preparando la muestra de la leche fermentada según el procedimiento de la AOAC Official Method 925.21.

Procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 4):

- Se calentó la mufla a una temperatura de 525 °C y se colocaron los crisoles a esa temperatura durante 1 hora en el horno.
- Empleando pinzas, se trasladaron los crisoles al desecador y se dejaron enfriar durante 45 minutos. Luego se pesaron en una balanza analítica.
- Las muestras se llevaron por duplicado a una temperatura de aproximadamente 20 °C y se homogenizaron con agitación vigorosa.
- Rápidamente se pesaron aproximadamente 5.0 g de muestra en su respectivo crisol en balanza analítica y luego se evaporaron hasta sequedad en baño de vapor.
- Posteriormente se calentaron las muestras en el horno a 525 °C hasta que la ceniza estuvo libre de carbono (partículas negras sin incinerar, se eliminaron, humedeciendo las cenizas con agua destilada, evaporando el agua sobre el baño maría hirviendo y volviendo a calcinar).
- Empleando pinzas, se trasladaron los crisoles al desecador, se dejaron enfriar 45 minutos y se pesaron.

- Posteriormente se determinó el porcentaje de cenizas con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{M - m}{P} \times 100$$

Dónde:

M = Peso del crisol y de las cenizas después de la incineración y enfriamiento posterior en gramos.

m = Peso del crisol vacío en gramos.

P = Peso en gramos de la muestra empleada en la determinación de las cenizas.

#### - **Grasa** <sup>(25)</sup>

Se determinó el porcentaje de grasa por el Método Roese-Gottlieb de la AOAC Official Method 905.02 modificado en la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE), preparando la muestra de la leche fermentada según el procedimiento de la AOAC Official Method 925.21.

Las muestras se llevaron por duplicado y a cada una se le realizó el siguiente procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 4):

- La muestra se llevó a una temperatura de aproximadamente 20 °C y se homogenizó con agitación vigorosa.
- Luego se pesó aproximadamente 10.0 g y se transfirió a un tubo de ensayo con capacidad de 100 mL.
- Se añadieron 2 mL de NH<sub>4</sub>OH y 10 mL de alcohol mezclando bien después de cada adición.
- Se añadieron 25 mL de éter dietílico libre de peróxidos, se tapó el tubo con un tapón de caucho sintético (que no es afectado por grasa ni por solventes), y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Se dejó enfriar durante 15 minutos.

- Luego se añadieron 25 mL de éter de petróleo ligero (p.e. 40-60 °C) y se agitó vigorosamente durante 30 segundos.
- Se centrifugó el tubo aproximadamente a 600 rpm durante 5 minutos.
- Se decantó la solución etérea en una cápsula de metal.
- Se lavaron las paredes del tubo de extracción, con una mezcla de partes iguales de los dos éteres usados anteriormente y se agregaron los lavados a la cápsula de metal.
- Se repitió dos veces la extracción al líquido remanente que estaba en el tubo, usando 15 mL de cada solvente.
- Se evaporaron los disolventes por completo en baño de vapor a una temperatura que no producía salpicaduras (se añadieron perlas de ebullición).
- Se colocó en la estufa la cápsula de metal a  $102 \pm 2$  °C para secar la grasa hasta peso constante, se dejó enfriar en desecador 5 minutos aproximadamente y peso en balanza analítica.
- Se removió la grasa completamente de la cápsula con 15 a 25 mL de éter de petróleo caliente, se volvió a secar y a pesar.
- La pérdida de peso equivale al peso de la grasa de la muestra.
- Se determinó el porcentaje de grasa con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{M - m}{P} \times 100$$

Dónde:

M = Peso en gramos de la cápsula de metal conteniendo la grasa desecada después de la extracción.

m = Peso en gramos de la capsula de metal vacía.

P = Peso en gramos de la muestra.

**- Proteína total** (25, 28)

Se determinó el porcentaje de proteína total por el método Kjeldhal de la AOAC Official Method 991.20 en la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE).

Procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 4):

**a) Preparación de la muestra**

- Se colocaron 15 g de  $K_2SO_4$ , 1 mL de una solución de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0.05 g/mL) y entre 8 a 10 perlas de ebullición en un balón Kjeldhal.
- Se llevo la muestra a  $38 \pm 1$  °C en baño María, se homogenizo vigorosamente con un agitador de vidrio, se dejó enfriar y se pesó 5.0 g e inmediatamente se colocó en el balón Kjeldhal.
- Se agregaron 25 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, por las paredes del balón Kjeldhal.

**b) Ajuste del calentador del digestor**

- Se precalentó el digestor durante 30 minutos.
- Se añadieron al balón Kjeldhal que contenía la muestra y el  $H_2SO_4$  concentrado, 250 mL de agua desmineralizada a 25 °C y entre 3 a 4 perlas de ebullición y se colocó el balón en el digestor precalentado.
- La temperatura máxima del digestor se logró en aproximadamente 5 a 6 minutos.

**c) Digestión**

- Se calentó la muestra durante 1.5 horas a la temperatura máxima del digestor hasta que presentara una coloración clara, luego se enfrió a temperatura ambiente.
- Se añadieron 300 mL de agua destilada al balón, se agitó y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente antes de la destilación.

## d) Destilación:

- Se encendió el condensador.
- Se añadieron 50 mL de solución al 4 % de ácido bórico y 1-2 gotas de indicador rojo de metilo-verde de bromocresol a un erlenmeyer de 500 mL y se colocó en el condensador con el extremo de este sumergido en el ácido bórico.
- Se añadieron con cuidado 75 mL de solución de NaOH al 50 % por la pared del balón Kjeldahl sin agitarlo.
- Inmediatamente se conectó el bulbo del balón de destilación en el condensador.
- Se agitó el balón vigorosamente para mezclar el contenido del fondo y se calentó hasta que todo el  $\text{NH}_3$  se había destilado. ( $\geq 150$  mL de destilado de volumen total).
- Se recibió el destilado en el erlenmeyer y se dejó drenar el líquido del extremo del condensador, el cual se lavó con agua destilada (aprox. 10 mL).
- Se apagó el calentador de destilación.
- Luego se retiró el destilado.

## e) Titulación:

- Se tituló el destilado directamente con solución de ácido clorhídrico 0.1 N, hasta el punto final (color rosado).
- Se realizó la determinación por duplicado y se llevó un blanco de reactivos.
- Posteriormente se calculó el % de nitrógeno con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{0.014007 \times (V_s - V_b) \times N}{P} \times 100$$

Donde:

$V_s$  y  $V_b$  = mL de solución de HCl 0.1 N usado para valorar la muestra y el blanco respectivamente

N = Normalidad de la solución de HCl

P = Peso de la porción de muestra en g.

0.014007 = Miliequivalentes de nitrógeno

Multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor 6.38 se obtuvo el porcentaje de proteínas presentes en la muestra <sup>(37)</sup>.

Los resultados de grasa, acidez titulable y proteína total se compararon con los parámetros establecidos por la Norma del *CODEX* para Leches Fermentadas *CODEX STAN 243-2003*.

#### **4.4.7. Análisis microbiológico**

Al producto idóneo obtenido por triplicado en las condiciones óptimas de fermentación a los cuales se les determinó las características sensoriales, acidez titulable y las determinaciones fisicoquímicas del numeral 4.4.6. se les realizó recuento de hongos y levaduras y recuento de coliformes totales.

Los resultados de estas determinaciones se compararon con los parámetros establecidos por la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones.

#### **- Preparación de la muestra <sup>(34)</sup>**

Se preparó cada una de las tres muestras según el método propuesto por el Manual de Análisis Bacteriológico en línea (BAM).

Procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 4):

- Se preparó la dilución  $10^{-1}$ , pesando 10 g de muestra de una forma aséptica en un frasco que contenía 90 mL de solución de buffer fosfato pH 7.2.
- Se transfirió el contenido del frasco a una bolsa de plástico estéril y se colocó en el Stomacher, agitándose por 30 segundos a 200 rpm.

- Luego se transfirió el contenido de la bolsa al frasco que contenía los 90 mL de solución de buffer fosfato pH 7.2. y se rotuló como dilución  $10^{-1}$ .
- Se procedió a preparar la dilución  $10^{-2}$ , agitando el frasco que contenía la dilución  $10^{-1}$  y de la cual se tomó 10 mL con una pipeta estéril. Estos 10 mL se adicionaron a un segundo frasco de dilución que contenía 90 mL de solución de buffer fosfato pH 7.2.
- Se agitó la dilución para homogenizarla y a continuación se procedió a preparar la dilución  $10^{-3}$ , tomando 10 mL de la dilución  $10^{-2}$ , con una pipeta estéril. Estos 10 mL se adicionaron a un tercer frasco de dilución que contenía 90 mL de solución de buffer fosfato pH 7.2. Se agitó la dilución para lograr homogenizarla.

#### **- Recuento de hongos y levaduras** <sup>(34)</sup>

El recuento de hongos y levaduras se hizo según el método de recuento en placa vertida propuesto por el BAM.

Procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 4):

- Se pipeteó 1 mL de la dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , por duplicado y se colocaron en placas de petri estériles debidamente rotuladas.
- Se adicionaron a cada una de las placas 20 mL de agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico (pH 3.5), llevado a una temperatura de 45°C, se mezclaron, se dejó solidificar el agar y luego se sellaron con tirro.
- Se invirtieron las placas e incubaron a temperatura ambiente durante 5 a 7 días. Se llevo un control del medio.
- Se observó el crecimiento de levaduras, estas se contaron con la ayuda de un cuenta colonias.



**- Recuento de coliformes totales** <sup>(15)</sup>

El recuento de coliformes totales se hizo por el método de recuento en placa vertida propuesto por el BAM.

Procedimiento (Ver esquema del procedimiento en anexo N° 4):

- Se pipeteó 1 mL de la dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , por duplicado y se colocaron en placas de petri estériles debidamente rotuladas.
- Se vertieron 20 mL de agar VRBA (agar bilis y rojo violeta) llevado a una temperatura de 45 °C, se mezclaron y se dejaron solidificar.
- Para prevenir el crecimiento en la superficie y la difusión de las colonias, se recubrieron las placas con 5 mL más de agar VRBA, y se dejaron solidificar.
- Se invirtieron las placas e incubaron a 32 °C durante 18 a 24 horas.

Si hubieran crecido colonias, se hubiera realizado el siguiente procedimiento para confirmar las coliformes totales:

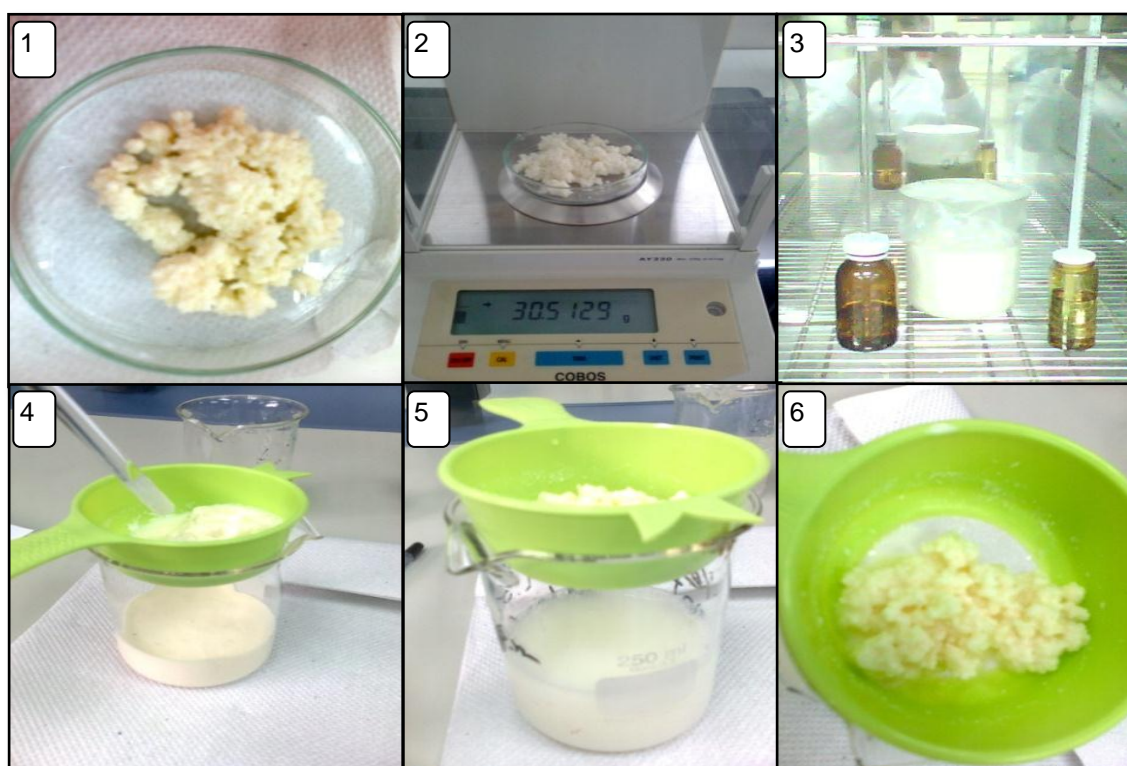
- Contar las colonias rojo-púrpura, que son de 0.5 mm o más de diámetro y rodeado de zona de precipitación de los ácidos biliares con ayuda de un cuenta colonias.
- Para confirmar que las colonias son coliformes, recoger por lo menos 10 colonias y trasladar cada una a un tubo de caldo BGLB (Lactosa Verde Brillante Bilis 2 %). Incubar los tubos a 35 °C. Examinar a las 24 y las 48 horas para la producción de gas.
- Determinar el número de coliformes por gramo multiplicando el número de colonias sospechosas por ciento confirmado en BGLB por el factor de dilución.

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**

## 5.0. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

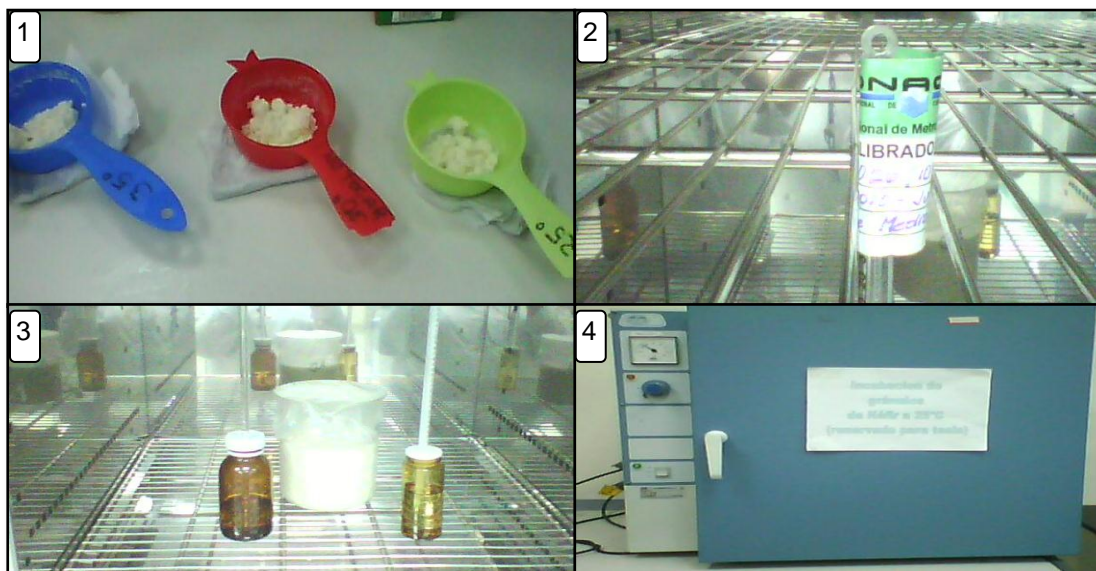
### - Activación, producción y acondicionamiento de los gránulos de kéfir

Antes de efectuar la estandarización del proceso de fermentación y los análisis fisicoquímicos y microbiológicos, se activaron los gránulos de kéfir y se incrementó su biomasa a 25 °C, según la metodología descrita en el numeral 4.4.1., como se muestra en la figura, durante dos meses, iniciando con 5.4449 g hasta obtener 49.9596 g.



**Fig. N° 3.** Activación y producción de gránulos de kéfir a nivel del laboratorio.

En la figura se observa el procedimiento para activar, aumentar la biomasa de los gránulos de kéfir y obtener la leche fermentada, esto se realizó antes del acondicionamiento de los gránulos de kéfir a 25 °C, 30 °C y 35 °C.



**Fig. N° 4.** Acondicionamiento de los gránulos de kéfir a 25 °C, 30 °C y 35 °C.

El acondicionamiento de los gránulos de kéfir se realizó a las temperaturas de ensayo dos veces consecutivas, durante el tiempo de fermentación especificado en la metodología descrita en el numeral 4.4.2, como se observa en la figura; para asegurar el mantenimiento de la temperatura, se colocaron termómetros en cada incubadora y se graduaron con un termómetro calibrado. Terminado este período se realizaron diez fermentaciones consecutivas.

La estandarización del proceso de fermentación de la leche entera UHT con gránulos de kéfir, la selección de las condiciones óptimas de fermentación, el análisis fisicoquímico y el análisis microbiológico que se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y en el Laboratorio Fisicoquímico, ambos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador y en la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE), dieron como resultado los datos que a continuación se presentan.

### - Determinación del aumento de biomasa de los gránulos de kéfir

**Tabla N°5.** Porcentajes del aumento de biomasa de los gránulos de kéfir por temperatura.

Aumento de biomasa a 25°C en 6 horas de fermentación (%)	Aumento de biomasa a 30 °C en 4 horas de fermentación (%)	Aumento de biomasa a 35°C en 3 horas de fermentación (%)
14.98	8.96	8.22
12.60	8.64	11.60
13.95	19.96	11.57
17.01	9.12	5.66
12.78	10.04	5.11
9.41	13.64	20.90
10.16	13.70	10.79
11.44	5.68	7.79
11.79	5.85	8.87
11.35	9.51	6.60

Los mayores porcentajes de aumento biomasa de los gránulos de kéfir obtenidos a cada temperatura de ensayo son los que están sombreados en la tabla, se observa que están fuera de tendencia. Para determinar si se rechazarían o se tomarían en cuenta en el ANOVA de biomasa de los gránulos de kéfir se utilizó el método de rango <sup>(44)</sup> que establece la prueba Q, el primer paso para utilizar ésta prueba es ordenar los resultados de menor a mayor como se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla N° 6.** Porcentajes del aumento de biomasa de los gránulos de kéfir ordenados de forma ascendente.

Aumento de biomasa a 25°C en 6 horas de fermentación (%)	Aumento de biomasa a 30 °C en 4 horas de fermentación (%)	Aumento de biomasa a 35°C en 3 horas de fermentación (%)
9.41	5.68	5.11

**Tabla N° 6.** Continuación.

Aumento de biomasa a 25°C en 6 horas de fermentación (%)	Aumento de biomasa a 30 °C en 4 horas de fermentación (%)	Aumento de biomasa a 35°C en 3 horas de fermentación (%)
10.16	5.85	5.66
11.35	8.64	6.60
11.44	8.96	7.79
11.71	9.12	8.22
12.70	9.55	8.87
12.78	10.04	10.79
13.95	13.64	11.57
14.98	13.7	11.60
17.01	19.96	20.90

A continuación se presenta un ejemplo para calcular el valor Q para la temperatura de 25 °C:

$$\text{Ámbito} = \text{Valor}_{\text{superior}} - \text{Valor}_{\text{inferior}}$$

$$\text{Ámbito} = 17.01\% - 9.41\% = 7.6\%$$

$$\text{Valor}_{\text{superior}} - \text{Valor}_{\text{anterior}} = 17.01\% - 14.98\% = 2.03\%$$

$$Q_{\text{calculado}} = \frac{\text{Valor}_{\text{superior}} - \text{Valor}_{\text{anterior}}}{\text{Ámbito}} = \frac{2.03}{7.6} = 0.26$$

Luego se eligió el valor Q de tabla para diez datos (Ver anexo N° 7) y se compararon ambos valores:

$$Q_{10} = 0.41$$

$$0.26 < 0.41$$

Como el valor Q calculado es menor que el de tabla, se acepta el valor de 17.01%. El procedimiento descrito anteriormente se realizó para calcular el valor Q de los datos que están sombreados, obtenidos a 30 °C y 35 °C, ambos

se eliminaron, porque el valor Q calculado fue mayor que el de tabla. Por lo tanto en el ANOVA que se detalla más adelante, se utilizaron 28 datos en total.

El motivo porque se presentaron estos datos fuera de tendencia, es porque las incubadoras no mantuvieron la temperatura a la cual habían sido previamente calibradas; éstas habían sido calibradas a una temperatura ambiental (con aire acondicionado) de 23 °C y debido al cambio de temperatura ambiental (fallas mecánicas del aire acondicionado), durante el período de fermentación, la temperatura de ensayo era mayor a la establecida así que se debía volver a calibrar la incubadora, siendo ésta la causa que provocó un mayor aumento de biomasa.

#### - Medición de pH



**Fig. N° 5.** Medición de pH.

La medición del pH se realizó según la metodología descrita en el capítulo 4. Se observa que previamente se calibraba el pH-metro con los buffer pH 7 y pH 4; luego de haber agitado la leche fermentada, se sumergía el electrodo directamente y la fermentación de la leche con los gránulos de kéfir se detenía cuando se había alcanzado un pH entre 4.2 a 4.6. El pH característico de la leche fermentada con gránulos de kéfir se logro en 6 horas a 25 °C, en 4 horas a 30 °C y en 3 horas a 35 °C.

Tabla N° 7. Valores de pH de la leche fermentada por temperatura.

pH de la leche fermentada a 25°C a las 6 horas de fermentación	pH de la leche fermentada a 30 °C a las 4 horas de fermentación	pH de la leche fermentada a 35°C a las 3 horas de fermentación
4.34	4.41	4.47
4.37	4.58	4.48
4.32	4.28	4.53
4.34	4.44	4.45
4.35	4.38	4.40
4.40	4.44	4.38
4.40	4.39	4.38
4.52	4.59	4.45
4.44	4.45	4.37
4.50	4.57	4.49

La tabla muestra los valores de pH obtenidos al final de la fermentación de la leche entera UHT con gránulos de kéfir a las tres temperaturas de ensayo durante diez fermentaciones consecutivas.

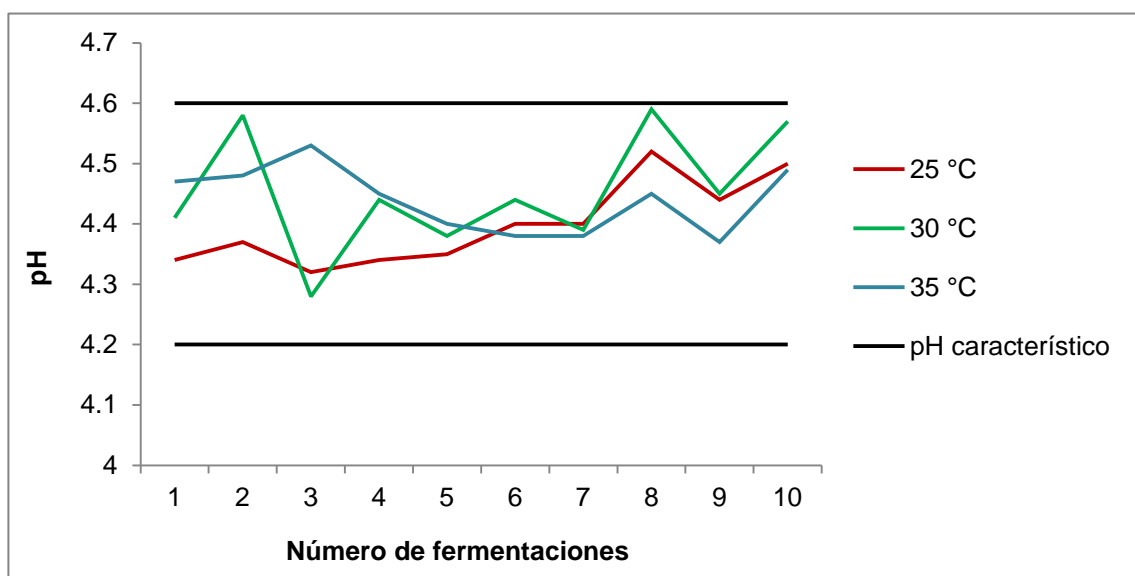
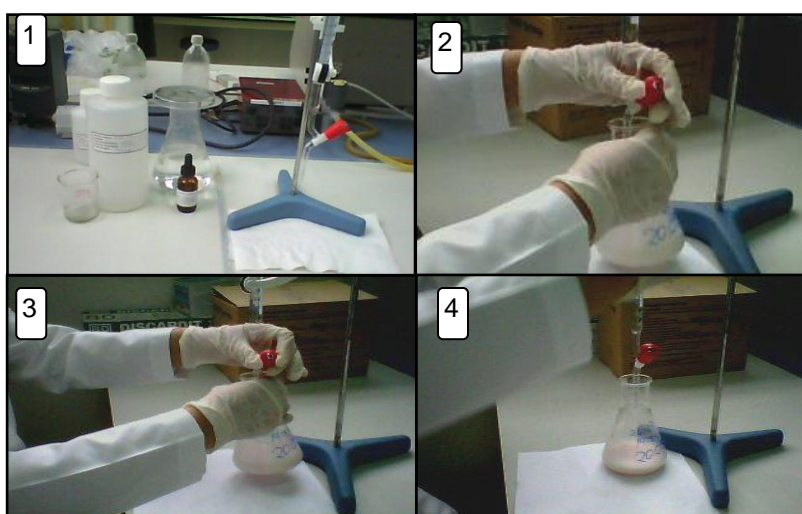


Fig. N° 6. Gráficos de pH por temperatura.



En la figura N° 6 se observa que los valores de pH obtenidos al final de la fermentación están en el rango de 4.2 a 4.6, pH establecido como característico, por la bibliografía <sup>(13)</sup>, para las leches fermentadas con gránulos de kéfir.

#### - Determinación de acidez titulable



**Fig. N° 7.** Determinación de acidez titulable.

Se observa el procedimiento para realizar la determinación de acidez titulable al producto de la fermentación de la leche entera con los gránulos de kéfir.

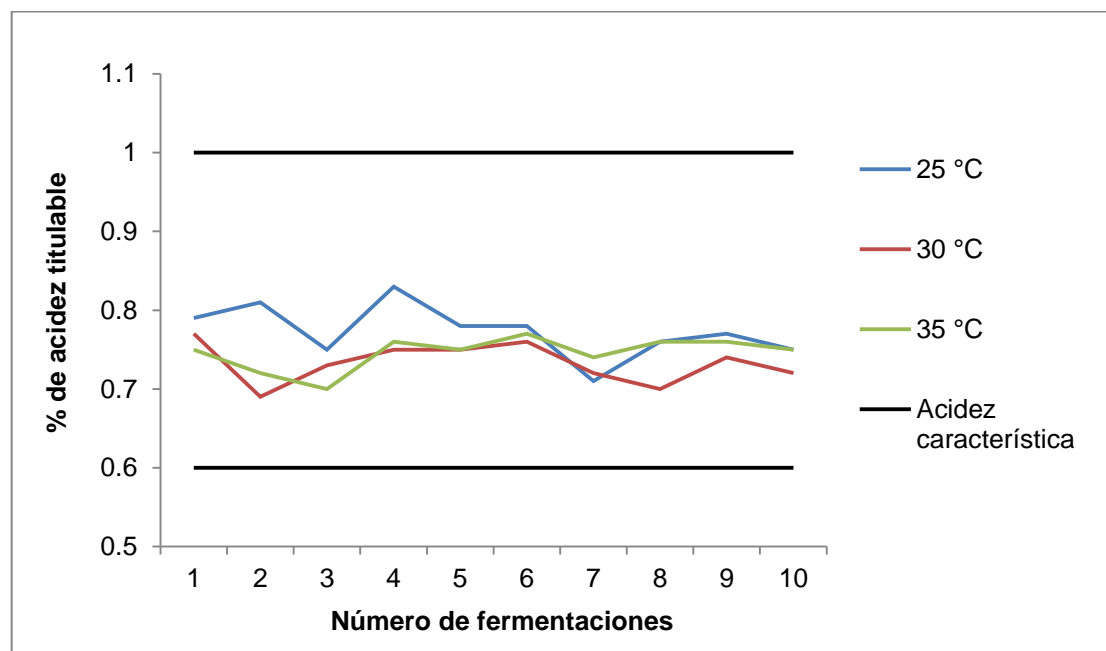
**Tabla N° 8.** Porcentajes de acidez titulable de la leche fermentada por temperatura.

Acidez de la leche fermentada (%) a 25 °C a las 6 horas de fermentación	Acidez de la leche fermentada (%) a 30 °C a las 4 horas de fermentación	Acidez de la leche fermentada (%) a 35 °C a las 3 horas de fermentación
0.79	0.77	0.75
0.81	0.69	0.72
0.75	0.73	0.70

**Tabla N° 8.** Continuación

Acidez de la leche fermentada (%) a 25 °C a las 6 horas de fermentación	Acidez de la leche fermentada (%) a 30 °C a las 4 horas de fermentación	Acidez de la leche fermentada (%) a 35 °C a las 3 horas de fermentación
0.83	0.75	0.76
0.78	0.75	0.75
0.78	0.76	0.77
0.71	0.72	0.74
0.76	0.70	0.76
0.77	0.74	0.76
0.75	0.72	0.75

Los valores presentados corresponden a cada una de las diez fermentaciones consecutivas. Se observa que los porcentajes de acidez se mantuvieron dentro del rango establecido como característico para las leches fermentadas con gránulos de kéfir de 0.6 a 1.0% de ácido láctico, lo cual se observa mejor en la siguiente figura.

**Fig. N° 8.** Gráficos de acidez titulable por temperatura.

### - Determinación de las características sensoriales



**Fig. N° 9.** Apariencia de la leche fermentada con gránulos de kéfir.

Se les determinó las características sensoriales a las treinta leches fermentadas obtenidas, diez a 25 °C, diez a 30 °C y diez a 35 °C y al producto idóneo. En el siguiente cuadro se presentan las características sensoriales para las leches fermentadas con gránulos de kéfir según la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones y los resultados obtenidos de ésta determinación.

**Cuadro N° 2.** Análisis sensorial de las diez leches fermentadas obtenidas a las temperaturas de ensayo durante diez fermentaciones consecutivas y del producto idóneo <sup>(27)</sup>.

<b>Característica organoléptica</b>	<b>Especificación</b>	<b>Resultado</b>	<b>Cumple con la NC-TS 457:2007</b>
Aspecto	Color uniforme. Blanco si es natural. Homogéneo.	Color blanco	Conforme a las especificaciones
Olor	Típico a producto lácteo fermentado, similar a la levadura fresca	Típico a producto lácteo fermentado	Conforme a las especificaciones
Sabor	Típico a producto lácteo fermentado, ligeramente ácido o agrio	Ligeramente ácido	Conforme a las especificaciones
Textura	Consistencia viscosa o cremosa	Consistencia cremosa	Conforme a las especificaciones

Los resultados obtenidos del análisis sensorial están conformes a lo que se establece en la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones

### - Determinación del tiempo de fermentación

**Tabla N° 9.** Tiempo de fermentación por temperatura.

Tiempo de fermentación a 25 °C (Horas)	Tiempo de fermentación a 30 °C (Horas)	Tiempo de fermentación a 35 °C (Horas)
6.00	4.05	3.00
6.05	4.05	3.00
6.00	4.00	3.00
6.00	4.06	3.00
6.00	4.00	3.00
6.00	4.00	3.5
6.00	4.15	3.00
6.00	4.00	3.00
6.00	4.00	3.00
6.00	4.00	3.00
6.00	4.00	3.00
$\bar{x} = 6.005$	$\bar{x} = 4.031$	$\bar{x} = 3.05$
$\sigma = 0.01581139$	$\sigma = 0.04886489$	$\sigma = 0.15811388$

Se determinó el tiempo de fermentación en horas, midiendo el pH a la preparación correspondiente a cada temperatura de ensayo, la medición se hizo al inicio de la fermentación y cada 2 horas durante  $6 \pm 0.01$  horas a 25 °C y  $4.03 \pm 0.05$  horas a 30 °C, a 35 °C la medición se hizo al inicio, 2 y 3 horas en un periodo de  $3 \pm 0.15$  horas; se observa que siguen la misma tendencia durante las diez fermentaciones consecutivas. Un pH de 4.2 a 4.6 indicaba el final de la fermentación, rango en el cual ocurre la precipitación de las principales proteínas de la leche (punto isoeléctrico).

Para seleccionar las condiciones óptimas de fermentación se realizó un análisis de varianza <sup>(47)</sup> (ANOVA de un solo factor) con los datos del porcentaje de aumento de biomasa de los gránulos de kéfir obtenidos durante las diez fermentaciones consecutivas utilizando el programa estadístico *STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.1.15*.

### - Análisis estadístico de los resultados del incremento de biomasa

En el análisis de varianza, se realiza una serie de pasos, siendo el primero de ellos el planteamiento de hipótesis, con la finalidad de poder aceptar o rechazar lo planteado, utilizando la prueba *F* como herramienta estadística de contraste. A continuación se presenta un resumen que se utilizó para realizar el ANOVA de un solo factor.

**Tabla N° 10.** Resumen estadístico para el aumento de biomasa de los gránulos de kéfir.

Temperatura (°C)	Numero de observaciones	Media	Desviación estándar
25	10	12.5490	2.2798
30	9	9.4644	2.8318
35	9	8.4677	2.4534
Total	28	10.2457	3.0189

La variable dependiente fue el aumento de biomasa, el factor o variable independiente la temperatura en tres niveles y se analizaron 28 observaciones. Se observa en la tabla que el mayor aumento medio de biomasa fue de  $12.55 \pm 2.28\%$  a 25 °C.

En la tabla ANOVA que se detalla más adelante se determinó si hubo diferencias significativas entre los promedios y se utilizó la prueba de múltiples rangos <sup>(4)</sup> para saber cuáles medias fueron significativamente diferentes de

otras, a continuación se presentan los pasos y resultados del análisis de varianza para seleccionar las condiciones óptimas de fermentación.

- Planteamiento de hipótesis

$$H_0 = \bar{X}_{25^\circ} = \bar{X}_{30^\circ} = \bar{X}_{35^\circ}$$

El aumento de biomasa promedio a una temperatura de fermentación de 25 °C no es mayor que a 30 °C y 35 °C.

$$H_a = \bar{X}_{25^\circ} \neq \bar{X}_{30^\circ} \text{ ó } \neq \bar{X}_{35^\circ}$$

El aumento de biomasa medio a una temperatura de fermentación de 25 °C es diferente que a 30 °C y 35 °C.

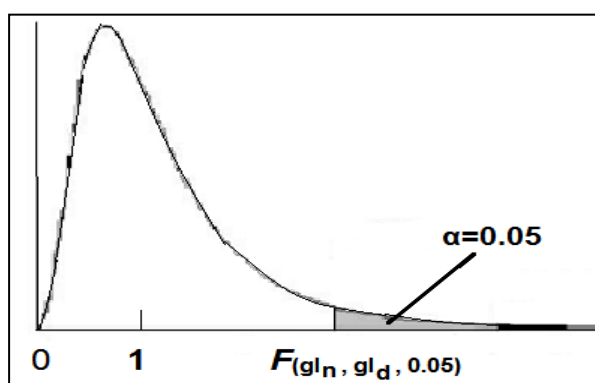
- Criterios del contraste <sup>(47)</sup>

Nivel de significancia:  $\alpha = 0.05$ .

Estadística de prueba o de contraste: Distribución  $F$ .

Valor crítico:  $F_{(2, 25, 0.05)} = 3.39$

(Ver los valores críticos de la distribución  $F$  en anexo N° 9)



**Fig. N° 10.** Curva de distribución  $F$

Se observa la curva de distribución  $F$ , en donde todos los valores que caen en la región crítica se rechazan y los que caen fuera se aceptan. Los valores

críticos de  $F$  registrados en la tabla N° 29 presentan un área bajo la curva a la derecha de 0.05, donde:

$gl_{(n)}$  = Grados de libertad del numerador.

$gl_{(d)}$  = Grados de libertad del denominador.

$\alpha = 0.05$  = Nivel de significancia.

- Cálculos estadísticos (Ver anexo N° 5)

Para rechazar o aceptar la hipótesis se calcula el valor  $F$  con la siguiente ecuación:

$$F = \frac{MC_{(Factor)}}{MC_{(Error)}}$$

Donde:

$F$  = Valor calculado de  $F$  para el factor en análisis.

$MC_{(Factor)}$  = Media de cuadrados del factor.

$MC_{(Error)}$  = Media de cuadrados del error.

**Tabla N° 11.** ANOVA para el aumento de biomasa de los gránulos de kéfir.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Media de cuadrados	Razón F	Valor P
Temperatura	86.9942	2	43.4971	6.84	0.0043
Error	159.0910	25	6.3636		
Total	246.0850	27			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Aumento de biomasa en dos varianzas, un varianza entre grupos, debido a los tres niveles de temperatura y una varianza dentro de grupos, debida al error de repetición. La razón  $F$ , que en este caso es igual a 6.84, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos.

Puesto que el valor  $P$  de la prueba  $F$  crítica es menor que 0.05 y el valor  $F$  calculado es mayor que  $F$  de tabla, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de aumento de biomasa a los niveles de temperatura probados, con un nivel del 95.0% de confianza, por tanto se rechazó la hipótesis nula.

Para determinar cuáles medias fueron significativamente diferentes de otras se utilizó la prueba de múltiples rangos, utilizando el LSD de Fisher <sup>(4)</sup>.

$$\text{LSD} = t_{0.05/2} \sqrt{\text{MC}_{(\text{Error})} \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

Donde:

LSD = Diferencia mínima significativa

$t_{0.05/2}$  = Valor de la distribución  $t$  tomado con los grados de libertad del error (Ver anexo N° 10)

$n_1$  = Tamaño de la población 1

$n_2$  = Tamaño de la población 2

Si la diferencia entre las medias de aumento de biomasa para cada par de temperaturas de fermentación es mayor que el límite calculado con el LSD existe diferencia significativa entre ellas.

**Tabla N° 12.** Comparación múltiple de medias del aumento de biomasa de los gránulos de kéfir.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
25 - 30	*	3.08456	2.38715
25 - 35	*	4.08122	2.38715
30 - 35		0.9967	2.44916

En esta tabla se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El



asterisco que se encuentra al lado de los dos pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza, ya que la diferencia entre cada par de media es mayor que el LSD.

También se realizó una estimación por intervalo de confianza de la diferencia entre dos medias poblacionales <sup>(4)</sup>, para determinar si cada intervalo de confianza de cada par de medias incluía el valor cero. Se rechaza la hipótesis nula si el intervalo calculado incluye el valor cero. Al realizar este análisis para cada par de medias se encontró diferencia significativa entre 25 °C y 30 °C, y entre 25 °C y 35 °C; entre 30 °C y 35 °C no existe diferencia significativa.

Para graficar las diferencias entre cada par de medias se calculo un intervalo de confianza <sup>(36)</sup> para cada una utilizando la tabla de valores críticos de la distribución normal estándar acumulada (Ver anexo N° 11) con un nivel de confianza del 95% con la siguiente ecuación:

$$\bar{X} - Z_{0.05/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{X} + Z_{0.05/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Donde:

$\bar{X}$  = Media muestral.

$Z_{0.05/2}$  = Valor de la distribución normal estándar que corresponde al porcentaje de 0.05/2.

$\sigma$  = Desviación estándar de la muestra.

$n$  = Tamaño de la población.

$\mu$  = Media

**Tabla N° 13.** Medias de aumento de biomasa por temperatura con intervalos de confianza del 95%.

Temperatura (°C)	Casos	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior	Grupos homogéneos
25	10	12.5490	0.7977	11.3870	13.7107	X
30	9	9.4644	0.8408	8.2398	10.6890	X
35	9	8.4677	0.8408	7.2432	9.6923	X
Total	28	10.2457				

Esta tabla muestra la media de aumento de biomasa para cada nivel de temperatura. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad del muestreo. El error estándar se calcula con la siguiente fórmula:

$$S_{\text{Estándar}} = \sqrt{\frac{SC_{(\text{Error})}}{n}}$$

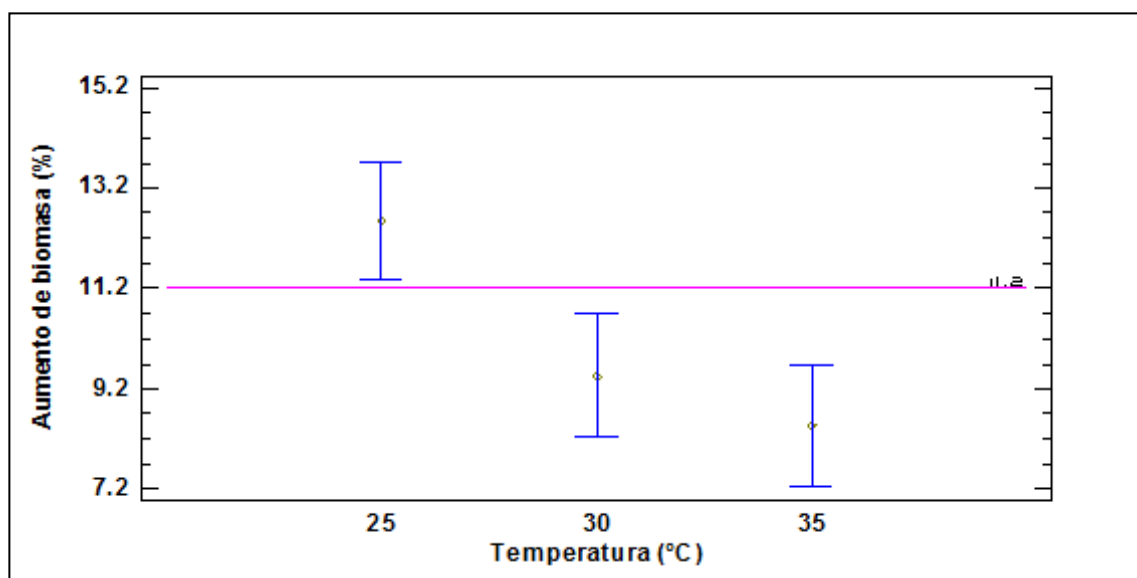
Donde:

S = Error estándar.

SC<sub>(Error)</sub> = Suma de cuadrados del error.

n = Número de observaciones en cada nivel.

En la tabla N° 13, se observan los valores del intervalo de confianza que se calcularon anteriormente y en la última columna se han identificado dos grupos homogéneos según la alineación de las X's en los cuales no existen diferencias estadísticamente significativas. Esto se visualiza mejor en la figura N° 11.



**Fig. N° 11.** Gráfica de medias de aumento de biomasa de los gránulos de kéfir por temperatura.

En la figura se muestra la media del aumento de biomasa para cada uno de los niveles de temperatura, ésta se representa por un punto ubicado en el centro del intervalo que está alrededor de cada media. Si hubiere dos medias que son iguales, sus intervalos se traslaparían verticalmente un 95.0% de las veces. Se observa que los intervalos de los promedios del aumento de biomasa a una temperatura de fermentación de 25 °C y 30 °C y de 25 °C y 35 °C no se traslapan verticalmente, por tanto, existe diferencia significativa entre ellos.

En consecuencia, las diferencias en las medias de producción de biomasa a los niveles de temperatura probados fueron significativas. El aumento de biomasa medio a una temperatura de fermentación de 25 °C es mayor que a 30 °C y a 35 °C; no se encontró diferencia significativa entre la producción de biomasa a las temperaturas de 30 °C y 35 °C.

### **- Selección de condiciones óptimas de fermentación**

Antes de realizar la parte experimental, se pretendía que las condiciones óptimas de fermentación estarían dadas por la temperatura que presentara la mayor producción de biomasa en el menor tiempo de fermentación con un pH y acidez titulable característicos para leches fermentadas con gránulos de kéfir; sin embargo los resultados difirieron de esta suposición, pues al comparar el aumento de biomasa y el tiempo de fermentación, se observa que a 35 °C se obtienen las fermentaciones en menor tiempo y según el ANOVA, a 25 °C el mayor aumento de biomasa, esto se debió probablemente a que a 25 °C, la fase de latencia de la simbiosis de bacterias que conforman al gránulo de kéfir se prolongó 3 horas más porque los microorganismos invirtieron mayor cantidad de tiempo en adecuar su metabolismo a esa temperatura, o que a 35 °C se solubilizó <sup>(55)</sup> mayor cantidad de kefirán disminuyendo así el peso final del gránulo.

Por lo tanto, se establecieron las condiciones óptimas de fermentación a una temperatura de 25 °C, durante un tiempo de fermentación de 6 horas, porque se obtiene mayor producción de biomasa, por ende aumenta la materia prima para elaborar mas leche fermentada, y según el cuadro N° 4 (ver anexo N°6), en El Salvador durante todo el año 2011 los promedios de temperatura no sobrepasaron los 30 °C, condiciones similares a las de laboratorio y porque cuando la inoculación de la leche se produce a 25 °C, el número de bacterias homofermentativas (sobre todo los lactobacilos) se ven favorecidos en comparación a una temperatura entre 18 °C y 20 °C, a una temperatura mayor de fermentación da lugar a un pH más bajo del característico, lo que inhibe el crecimiento de estreptococos, levaduras y bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas <sup>(13)</sup> que podría reflejarse en un recuento de levaduras presentes en la leche fermentada con gránulos de kéfir menor de

$10^4$  UFC/g y no estaría cumpliendo con la Norma Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones.

Durante el proceso de estandarización se observó lo siguiente: a menor temperatura mayor tiempo de fermentación y a mayor temperatura menor tiempo de fermentación.

Para determinar si existe diferencia significativa entre las medias de cada factor y comprobar si la interacción entre ambos produce como consecuencia un descenso en el pH, se realizó un análisis de varianza <sup>(47, 26)</sup> (ANOVA de dos factores) con los datos de pH obtenidos experimentalmente durante diez fermentaciones consecutivas y los obtenidos con las ecuaciones de las gráficas de pH vrs. tiempo de fermentación, correspondientes a cada temperatura de ensayo de ensayo, cuya tendencia es lineal utilizando el programa estadístico *STATGRAPHICS Centurion VXi Versión 16.1.15*.

#### **- Análisis estadístico de los resultados de la medición de pH**

El procedimiento para analizar la influencia de dos factores sobre una variable respuesta es similar al análisis de un solo factor. La variable dependiente es el pH y los factores fueron el tiempo de fermentación y la temperatura, se utilizaron 120 observaciones.

- Planteamiento de las hipótesis.

$$H_0 : \tau_i^A = 0$$

No existe diferencia significativa entre las medias de las temperaturas de fermentación.

$$H_a : \tau_i^A \neq 0$$

Existe diferencia significativa entre las medias de las temperaturas de fermentación.

$$H_0 : \tau_j^B = 0$$

No existe diferencia significativa entre las medias de los tiempos de fermentación.

$$H_a : \tau_j^B \neq 0$$

Existe diferencia significativa entre las medias de los tiempos de fermentación.

$$H_0 : \tau_{ij}^{AB} = 0$$

No existe diferencia significativa entre las interacciones; es decir, el tiempo de fermentación sobre el pH no depende de la temperatura.

$$H_a : \tau_{ij}^{AB} \neq 0$$

Existe diferencia significativa entre las interacciones; es decir, el tiempo de fermentación sobre el pH depende de la temperatura.

- Criterios del contraste <sup>(47)</sup>

Nivel de significancia:  $\alpha = 0.05$

Estadística de prueba o de contraste: Distribución  $F$  (Ver anexo N° 8)

Valores críticos:  $F_{(2, 108, 0.05)} = 3.14$

$$F_{(3,108,0.05)} = 2.75$$

$$F_{(6,108,0.05)} = 2.24$$

- Cálculos estadísticos (Ver anexo N° 5)

Experimentalmente se alcanzó el pH característico en 6 horas a 25 °C, en 4 horas a 30 °C y en 3 horas a 35 °C, así que para poder realizar el análisis factorial, se calculó el pH a las 6 horas de fermentación a 30 °C y a las 4 y 6 horas a 35 °C, utilizando las ecuaciones de las gráficas de pH vrs. tiempo de fermentación obtenidas en diez fermentaciones consecutivas (cuya tendencia es lineal y un  $R^2$  cercano a 1) y a continuación se presentan los resultados:

**Tabla N° 14.** Ecuaciones obtenidas de las gráficas de pH por temperatura.

Numero de fermentaciones	30 °C	35 °C
1	$y = - 0.4925x + 6.505$	$y = - 0.415x + 6.43$
2	$y = - 0.48x + 6.5067$	$y = - 0.54x + 6.5$
3	$y = - 0.545x + 6.59$	$y = - 0.565x + 6.45$
4	$y = - 0.48x + 6.4667$	$y = - 0.705x + 6.64$
5	$y = - 0.5525x + 6.7083$	$y = - 0.505x + 6.41$
6	$y = - 0.5075x + 6.495$	$y = - 0.58x + 6.56$
7	$y = - 0.495x + 6.5233$	$y = - 0.49x + 6.36$
8	$y = - 0.48x + 6.6067$	$y = - 0.575x + 6.45$
9	$y = - 0.48x + 6.5$	$y = - 0.75x + 6.64$
10	$y = - 0.51x + 6.64$	$y = - 0.725x + 6.74$

En la siguiente tabla se presentan los valores de pH obtenidos experimentalmente, los valores en color azul son los resultados obtenidos de las ecuaciones; se encuentran ordenados, para realizar el ANOVA de dos factores.

**Tabla N° 15.** Datos de pH por temperatura y tiempo de fermentación.

Factor A Temperatura (°C)	Factor B Tiempo de fermentación				TOTAL
	0 h	2 h	4 h	6 h	
25	6.46	5.60	4.78	4.37	216.55
	6.52	5.76	4.83	4.40	
	6.53	5.73	4.96	4.36	
	6.59	5.92	4.83	4.47	
	6.61	5.82	4.97	4.40	
	6.40	5.56	4.95	4.46	
	6.35	5.89	4.86	4.45	
	6.48	5.95	4.90	4.55	
	6.38	5.91	4.94	4.51	
	6.72	5.80	5.04	4.54	
TOTAL	65.04	57.94	49.06	44.51	

Tabla N° 15. Continuación.

Factor A Temperatura (°C)	Factor B Tiempo de fermentación				TOTAL
	0 h	2 h	4 h	6 h	
30	6.45	5.63	4.48	3.55	201.9
	6.52	5.52	4.60	3.63	
	6.52	5.64	4.34	3.32	
	6.38	5.68	4.46	3.59	
	6.66	5.70	4.45	3.39	
	6.50	5.47	4.47	3.45	
	6.42	5.74	4.44	3.55	
	6.51	5.84	4.59	3.73	
	6.45	5.64	4.53	3.62	
	6.62	5.66	4.58	3.58	
TOTAL	65.03	56.52	44.94	35.41	
35	6.43	5.60	4.77	3.94	190.51
	6.50	5.42	4.34	3.26	
	6.45	5.32	4.19	3.06	
	6.64	5.23	3.82	2.41	
	6.41	5.40	4.39	3.38	
	6.56	5.40	4.24	3.08	
	6.36	5.38	4.40	3.42	
	6.45	5.30	4.15	3.00	
	6.64	5.14	3.63	2.14	
	6.74	5.29	3.84	2.39	
TOTAL	65.18	53.48	41.77	30.08	
TOTAL	195.25	167.94	135.77	110.00	608.97

Para rechazar o aceptar la hipótesis se calcula el valor  $F$  para cada factor y para la interacción de ambos sobre el descenso del pH, con las siguientes ecuaciones:

$$F_A = \frac{MC_{(\text{Temperatura})}}{MC_{(\text{Error})}}$$



$$F_B = \frac{MC_{(\text{Tiempo de fermentación})}}{MC_{(\text{Error})}}$$

$$F_{(AB)} = \frac{MC_{(AB)}}{MC_{(\text{Error})}}$$

Donde:

$F_{(AB)}$  = Valor calculado de  $F$  para la interacción de A y B.

$F_{(A)}$  = Valor calculado de  $F$  para el factor A.

$F_{(B)}$  = Valor calculado de  $F$  para el factor B.

$MC_{(AB)}$  = Media de cuadrados para la interacción de A y B.

$MC_{(\text{Error})}$  = Media de cuadrados del error.

**Tabla N° 16.** ANOVA de dos factores para pH.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media de cuadrados</b>	<b>Razón F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Efectos Principales</b>					
A:Temperatura (°C)	8.5203	2	4.2601	96.46	0.0000
B:Tiempo de fermentación (Hrs)	138.3940	3	46.1314	1044.49	0.0000
Interacción AB	5.8398	6	0.9733	22.04	0.0000
Error	4.77	108	0.0441667		
Total	157.5240	119			

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de pH en dos factores que afectan el pH. Los valores P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que los 3 valores P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el pH con un nivel de confianza del 95.0%, por lo tanto se rechazó la hipótesis nula.

Según el análisis realizado el  $F_A > F_{(2, 108, 0.05)}$  lo que indica que existe diferencia significativa entre las medias de pH para cada temperatura de fermentación, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula para el factor A.

Para el factor B, el  $F_B > F_{(3, 108, 0.05)}$  lo que indica que existe diferencia significativa entre las medias de pH para cada tiempo de fermentación, se rechaza la hipótesis nula.

Para la interacción  $F_{AB} > F_{(6, 108, 0.05)}$  lo que indica que existe diferencia significativa entre las interacciones; es decir, el tiempo de fermentación sobre el pH depende de la temperatura y se produce como consecuencia un descenso en el pH, se rechaza la hipótesis nula.

Para determinar cuáles medias fueron significativamente diferentes de otras se utilizó la prueba de múltiples rangos <sup>(4)</sup>, utilizando el LSD de Fisher con los datos de la siguiente tabla.

**Tabla N° 17.** Medias de cuadrados para pH con intervalos de confianza del 95.0%.

Nivel	Casos	Media	Error estándar	Límite Inferior	Límite Superior
<b>Media global</b>	120	5.0746			
<b>Tiempo de fermentación (Hrs)</b>					
0	30	6.5083	0.03836	6.43228	6.5843
2	30	5.5980	0.03836	5.52194	5.6740
4	30	4.5256	0.03836	4.44961	4.6017
6	30	3.6666	0.03836	3.59061	3.7427
<b>Temperatura (°C)</b>					
25	40	5.4137	0.03322	5.3478	5.4796
30	40	5.0475	0.03322	4.9816	5.1133

**Tabla N° 17.** Continuación.

<b>Nivel</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Límite Inferior</b>	<b>Límite Superior</b>
<b>Temperatura (°C)</b>					
35	40	4.7627	0.03322	4.6968	4.8286
<b>Tiempo de fermentación (Hrs), por temperatura (°C)</b>					
0,25	10	6.5040	0.066458	6.37227	6.63573
0,30	10	6.5030	0.066458	6.37127	6.63473
0,35	10	6.5180	0.066458	6.38627	6.64973
2,25	10	5.7940	0.066458	5.66227	5.92573
2,30	10	5.6520	0.066458	5.52027	5.78373
2,35	10	5.3480	0.066458	5.21627	5.47973
4,25	10	4.9060	0.066458	4.77427	5.03773
4,30	10	4.4940	0.066458	4.36227	4.62573
4,35	10	4.1770	0.066458	4.04527	4.30873
6,25	10	4.4510	0.066458	4.31927	4.58273
6,30	10	3.5410	0.066458	3.40927	3.67273
6,35	10	3.0080	0.066458	2.87627	3.13973

Esta tabla muestra la media de pH para cada uno de los niveles de los factores. También muestra el número de observaciones que se utilizaron para el análisis y los errores estándar de cada media, los cuales son una medida de la variabilidad del muestreo, así como el valor de pH con las combinaciones de temperatura y tiempo de fermentación.

Las dos columnas del extremo derecho muestran intervalos de confianza del 95.0% para cada una de las medias construidos con la distribución normal estándar acumulada (Ver anexo N° 11).

Los valores de las medias se introdujeron en la ecuación de LSD, luego se realizó una comparación múltiple entre cada par de medias de pH.

**Tabla N° 18.** Comparación múltiple entre las medias de pH.

<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
0 – 2	*	0.910333	0.107558
0 – 4	*	1.98267	0.107558
0 – 6	*	2.84167	0.107558
2 – 4	*	1.07233	0.107558
2 – 6	*	1.93133	0.107558
4 – 6	*	0.859	0.107558

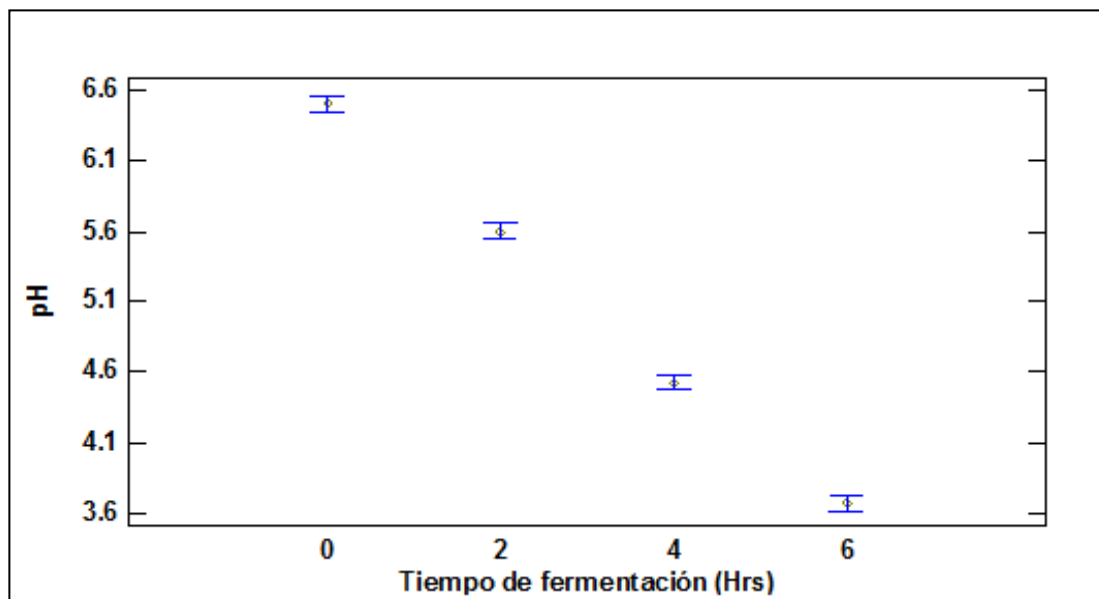
Se observa en la tercera columna, las diferencias estimadas entre cada par de medias y en la última columna el límite calculado con el LSD. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares presentan diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95.0%.

**Tabla N° 19.** Tabla de medias para pH por tiempo de fermentación.

<b>Tiempo de fermentación (Hrs)</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
0	30	6.50833	X
2	30	5.598	X
4	30	4.52567	X
6	30	3.66667	X

En esta tabla se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

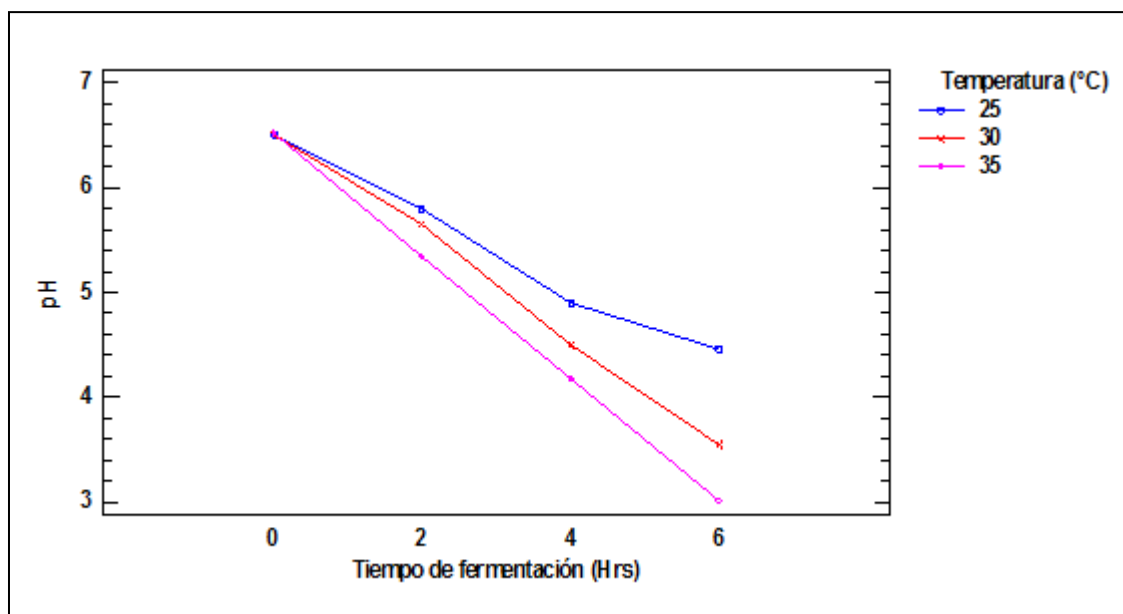
Estas diferencias se graficaron utilizando el intervalo de confianza de la tabla N° 17 para cada media de pH por tiempo de fermentación utilizando la distribución estándar acumulada (Ver anexo N° 11).



**Fig. N° 12.** Gráfica de medias de pH por tiempo de fermentación.

En esta figura se muestra la media de pH ésta se representa por un punto ubicado en el centro del intervalo que está alrededor de cada media para cada tiempo de fermentación. Si hubiere dos medias que son iguales, sus intervalos se traslaparían verticalmente un 95.0% de las veces. Se observa que ningún par de medias se traslapan verticalmente, por ende tienen una diferencia estadísticamente significativa.

Por tanto, el tiempo y la temperatura de fermentación ejercen un efecto sobre el descenso del pH, es decir, existe una interacción entre ambos factores, esta interacción se puede graficar utilizando los valores de las medias de pH para cada tiempo de fermentación por temperatura que se encuentra en la tabla N° 17.



**Fig. N° 13.** Interacción entre la temperatura y el tiempo de fermentación sobre el pH de la leche.

En la figura se observan 3 líneas trazadas, que representan cada uno de los niveles de temperatura. Conectan las medias de pH para cada tiempo de fermentación. Si no existiera ninguna interacción, estas líneas serían paralelas y no se cruzarían entre ellas. Entre más fuerte sea la interacción, más diferente será la forma de las líneas.

#### **- Control de calidad de los productos de fermentación**

Luego del análisis de los resultados de las diez fermentaciones consecutivas, se elaboró un producto idóneo por triplicado, a 25 °C durante 6 horas de fermentación. A éstos, se les realizaron determinaciones fisicoquímicas de acidez titulable, humedad, sólidos totales, cenizas, grasa y proteína total (Ver anexo N° 12) en los laboratorios de análisis fisicoquímico y de análisis microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) y en el Laboratorio de la Fundación Salvadoreña para investigaciones del café (PROCAFE).

**Tabla N° 20.** Resultados de las determinaciones fisicoquímicas realizadas al producto idóneo.

Determinación	Resultados			Promedio	Desviación estándar
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
Acidez titulable (%)	0.76	0.77	0.78	0.77	0.01
Humedad (%)	88.48	89.16	89.5	89.04	0.51
Sólidos totales (%)	11.53	10.84	10.5	10.95	0.52
Cenizas (%)	0.68	0.70	0.70	0.69	0.01
Grasa (%)	2.93	3.42	3.58	3.31	0.34
Proteína total (%)	3.54	3.00	3.13	3.22	0.28

Se observa que el porcentaje de acidez titulable de la leche fermentada con gránulos de kéfir es de  $0.77 \pm 0.01\%$ , el de grasa es de  $3.31 \pm 0.34\%$  y el de proteína total de  $3.22 \pm 0.28\%$ , por tanto están conforme con las especificaciones establecidas por la Norma Internacional *CODEX STAN 243-2003* Norma del *CODEX* para Leches Fermentadas, que especifica 0.60% mínimo de acidez titulable como ácido láctico, menos del 10% para grasa y mínimo de 2.7% de proteína láctea para leche entera como se observa en la siguiente tabla.

**Tabla N° 21.** Comparación de los resultados fisicoquímicos con la Norma del *CODEX*.

Determinación	Especificación	Resultado promedio	Cumple con la Norma <i>CODEX</i>
Acidez titulable (%)	Mín. 0.60%	$0.77 \pm 0.01 \%$	Conforme
Grasa (%)	< 10%	$3.31 \pm 0.34 \%$	Conforme
Proteína total (%)	Mín. 2.7%	$3.22 \pm 0.28 \%$	Conforme

Según la tabla N° 2, el porcentaje de humedad debe ser de 87.5% y se obtuvo un valor de  $89.04 \pm 0.52\%$ , esta diferencia, pudo haberse debido a que antes de preparar la leche con los gránulos, a éstos, les quedara agua, por lavarse antes y después de cada fermentación y que al escurrirlos no la perdieron toda

permaneciendo en la superficie, así que le confiere cierta cantidad de agua al producto. El porcentaje de humedad es útil porque influye en la textura, sabor y apariencia del producto final.

En la tabla N° 20 se observa que se obtuvo un valor de  $10.96 \pm 0.52\%$  de sólidos totales y un valor de  $0.69 \pm 0.01\%$  de cenizas, ésta determinación es útil para conocer si el producto presenta adulteraciones, ambos parámetros pueden ser utilizados para la elaboración de la norma salvadoreña para leche fermentada con gránulos de kéfir. También se realizaron determinaciones microbiológicas de recuento de coliformes totales y recuento de hongos y levaduras.

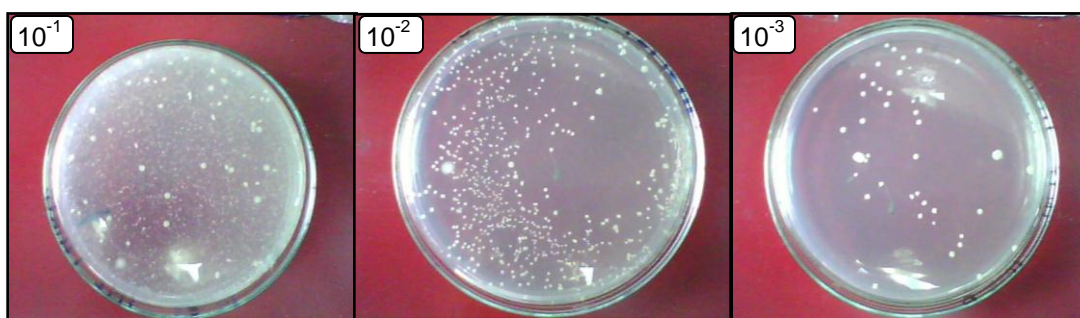
**Tabla N° 22.** Resultados de las determinaciones microbiológicas realizadas al producto idóneo.

Determinación	Especificación	Resultado			Cumple con la NC-TS 457:2007
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
Recuento de Hongos UFC/g	Max. $\leq 100$ UFC/g	$\leq 10$ UFC/g	$\leq 10$ UFC/g	$\leq 10$ UFC/g	Conforme
Recuento de Levaduras UFC/g	Min. $10^4$	$1.2 \times 10^5$ UFC/g	$9.6 \times 10^4$ UFC/g	$1.2 \times 10^5$ UFC/g	Conforme
Recuento de coliformes totales UFC/g	Max. $\leq 100$ UFC/g	$\leq 10$ UFC/g	$\leq 10$ UFC/g	$\leq 10$ UFC/g	Conforme

La especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones, establece un conteo de hongos y levaduras para las leches fermentadas, para la leche fermentada con gránulos de kéfir hace un conteo mínimo de levaduras viables como requisito microbiológico, para que ejerza su efecto probiótico. En la prueba de recuento de hongos y levaduras realizada al

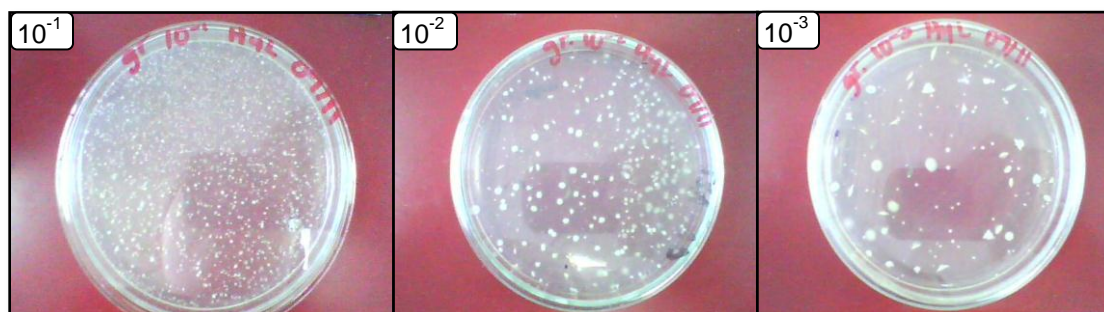


producto idóneo no se identificaron hongos solo levaduras, para verificar que éstas procedían de los gránulos de kéfir a éstos se les realizó la misma prueba, a continuación se presentan los resultados de la prueba en las siguientes figuras.



**Fig. N° 14.** Recuento de hongos y levaduras del producto idóneo

En la figura se muestra que las levaduras presentes en el producto idóneo son colonias lisas, color crema, brillantes y de forma ovoide, al compararlas con la siguiente figura se observa que éstas presentan igual morfología macroscópica a las levaduras presentes en los gránulos de kéfir, por tanto el producto idóneo cumple con los requisitos microbiológicos de recuento de coliformes totales y recuento de hongos y levaduras.



**Fig. N° 15.** Recuento de hongos y levaduras de los gránulos de kéfir.

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0. CONCLUSIONES

1. La producción de biomasa de los gránulos de kéfir fue de  $12.55 \pm 2.28\%$  a 25 °C en  $6.00 \pm 0.02$  horas, de  $9.46 \pm 2.83\%$  a 30 °C en  $4.03 \pm 0.04$  horas y de  $8.46 \pm 2.45\%$  a 35 °C en  $3 \pm 0.15$  horas. Según el análisis de varianza realizado el aumento de biomasa medio a 25 °C es mayor que a 30 °C y 35 °C, estableciéndose las condiciones óptimas de fermentación a 25 °C.
2. Se ha demostrado que existe diferencia significativa entre las medias de pH en los 3 niveles de temperatura de fermentación correspondientes a 25 °C, 30 °C y 35 °C, también entre las medias de pH de los tiempos de fermentación y que el tiempo de fermentación, depende de la temperatura, por ende se produce un descenso en el pH de la leche entera UHT durante el proceso de fermentación.
3. Los resultados obtenidos de acidez, grasa y proteína total del producto idóneo de fermentación son conformes con las especificaciones establecidas por la Norma Internacional *CODEX STAN 243-2003* Norma del *CODEX* para Leches Fermentadas y las características sensoriales, coliformes totales, recuento de hongos y levaduras cumplen con las especificaciones establecidas en la Norma Cubana *NC-TS 457:2007* Leches fermentadas-especificaciones, por lo tanto es apto para el consumo humano.
4. Los resultados de humedad ( $89.04 \pm 0.52\%$ ), sólidos totales ( $10.96 \pm 0.52\%$ ) y cenizas ( $0.69 \pm 0.01\%$ ), pueden ser utilizados para la elaboración de la norma salvadoreña para leches fermentadas con gránulos de kéfir a nivel industrial, ya que permiten observar otras características de calidad del

producto no contempladas en las normativas actuales para Leches Fermentadas.

5. En general, según los resultados obtenidos, las condiciones óptimas de fermentación de la leche entera ultrapasteurizada con gránulos de kéfir se presenta a una temperatura de 25 °C durante 6 horas, porque se obtiene mayor biomasa, con un pH y acidez titulable conforme a los parámetros establecidos para leches fermentadas con gránulos de kéfir.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0. RECOMENDACIONES

1. Que la Universidad de El Salvador, a través del centro de investigación y desarrollo en salud (CENSALUD), gestione proyectos para adquirir los gránulos de kéfir y así intensificar las investigaciones sobre éstos y sobre la leche fermentada para dar continuidad a otros proyectos.
2. Que las entidades del área de alimentos del país puedan obtener bibliografía a partir de las investigaciones de los estudiantes de la Facultad de Química y Farmacia, sobre las propiedades probióticas de la leche fermentada con gránulos de kéfir.
3. Que se realicen investigaciones sobre los gránulos de kéfir, determinando los componentes que crecen en mayor proporción en la biomasa total, a diferentes temperaturas, tomando en cuenta como factor crítico el pH y la acidez titulable expresada en términos de ácido láctico durante las fermentaciones.
4. Realizar proyecto de elaboración de leche fermentada con gránulos de kéfir que contenga saborizante, efectuando pruebas hedónicas en niños pequeños de guardería para determinar el grado de aceptación y previamente determinar por medio de la prueba de la lactosa cuales niños son intolerantes a ésta enzima.
5. Desarrollar proyecto de investigación que consista en evaluar si el consumo de la leche fermentada con gránulos de kéfir influye en el peso de niños cuyas edades oscilen entre los tres a doce años y previamente determinar

por medio de la prueba de la lactosa cuales niños son intolerantes a ésta enzima.

6. Ejecutar proyecto de elaboración de leche fermentada con gránulos de kéfir a nivel de planta piloto y considerar factores económicos, método de fabricación (diferentes temperaturas de fermentación, velocidad de agitación, tipo de leche y origen de los gránulos) y recursos humanos que garanticen un producto nutritivo, inocuo y económico antes de llevar la producción a nivel industrial.
7. Realizar una validación del método de fermentación, tomando en cuenta la temperatura y los tiempos de fermentación, así como la escala de producción a la que se utilice.
8. Que el Sistema Nacional de Calidad a través de la Comisión Técnica de Reglamentación, elabore una norma para leches fermentadas con gránulos de kéfir realizando otros ensayos e incluyendo los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos realizados en este trabajo.
9. Que al ejecutar el proyecto de elaboración de leche fermentada con gránulos de kéfir a nivel de planta piloto se deba incluir en el sistema de alimentación de las escuelas y en las comunidades de más bajos recursos de El Salvador, el consumo de leches fermentadas con gránulos de kéfir, ya que por su alto contenido en bacterias probióticas y su contenido nutricional, serán beneficiadas las personas que lo consuman.

10. Que el Ministerio de Salud Pública (MINSAL), implemente un sistema de vigilancia, con el fin de conocer el cumplimiento de la norma para leches fermentadas con gránulos de kéfir y así, el producto que se elaborará artesanalmente a nivel nacional en comunidades de más bajos recursos y escuelas sea de la más alta calidad, siendo apto para el consumo humano.



## BIBLIOGRAFIA

1. Abrunhosa L, Paterson R. M, Venâncio A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. Toxins 2010 [Revista en línea] 2010 [Acceso 26 de febrero de 2011] 2: [1078-1099] Disponible en: [http://achemmic.com/files/Biodegradation\\_of\\_Ochratoxin\\_A\\_for\\_Food\\_and\\_Feed\\_Decontamination\\_2010.pdf](http://achemmic.com/files/Biodegradation_of_Ochratoxin_A_for_Food_and_Feed_Decontamination_2010.pdf)
2. Ahmed A. I, Mohamed F. G, Ayman K. E. Some physicochemical analyses of kefir produced under different fermentation conditions. Journal of Scientific & Industrial Research [Revista en línea] 2011 May [Acceso 23 de febrero de 2011]; 70: [365-372]. Disponible en: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/11645/3/JSIR%2070%285%29%20365-372.pdf>
3. Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08. Anexo de resolución no. 243-2009. [Acceso el 19 de abril de 2011]. Disponible en: [http://www.cacia.org/documentos/Criterios\\_microbiologicos.pd.pdf](http://www.cacia.org/documentos/Criterios_microbiologicos.pd.pdf)
4. Anderson, David R., Dennis, J. Sweeney, Thomas A. Williams. Estadística para Administración y Economía. 10 ° edición. Cengage Learning Editores, S.A de C.V. México, DF. 2008. <http://books.google.com.sv/books?id=ehmBzUUZdzUC&pg=PA510&lpg=PA510&dq=encontrar+intervalos+por+LSD+de+fisher&source=bl&ots=-dXFA1Jqm1&sig=c0Te5eZ5hpSRC4oUHjDDG7nm5Bs&hl=es&sa=X&ei=tY42T4G4N5SXtwez0tC1Ag&ved=0CCEQ6AEwAA#v=onepage&q=encontrar%20intervalos%20por%20LSD%20de%20fisher&f=false>
5. Anselmo R.J, Viora S.S, Lausada L.I. Efecto del Bactericida Kéfir sobre *Salmonella* spp. Revista Internacional Chilena [Revista en línea] 2001

[Acceso 8 de febrero de 2011]; 12 (5): [91-96]. Disponible en: <http://books.google.com.sv/books?id=WPLrWIW7CJAC&pg=PA91&lpg=PA91&dq=efecto+del+bactericida+kefir+sobre+salmonella+spp&source=bl&ots=p0nFGomfaV&sig=jmSGn>

6. Aranceta J, Serra LI. Leche, Lácteos y Salud [Libro en línea]. Madrid: Editorial Médica Panamerica, 2005, pags. 5-6 [Acceso 23 de febrero de 2011].  
Disponible en:  
[http://books.google.com.sv/books?id=RnR9M8HTOngC&printsec=frontcover&dq=Leche,+L%C3%A1cteos+y+Salud&hl=es&ei=tCM\\_TrLJNYL50gGdwcnKAw&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=RnR9M8HTOngC&printsec=frontcover&dq=Leche,+L%C3%A1cteos+y+Salud&hl=es&ei=tCM_TrLJNYL50gGdwcnKAw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q&f=false)
7. Calderón G. Consultora FAO. Estudio de caso – Enfermedades transmitidas por alimentos en El Salvador. [Acceso el 28 de julio de 2011]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0480s/i0480s03.pdf>
8. Chujian Ch. Antitumor Properties of Kefir: Possible Bioactive Component(s) and Mechanism(s). [tesis doctoral]. Canada: Heritagz Branch. 2005.
9. CODEX alimentarius. Código Internacional de Practicas Recomendado - Principios Generales de Higiene de los Alimentos. CAC/RCP 1-1969, Rev 4 (2003). 1-35. [Acceso el 19 de abril de 2011]. Disponible en: <http://www.pes.fvet.edu.uy/cursos/mail.pdf>
10. Danone.com, Dieta y nutrición [sede Web]. Argentina: Danone.com; 2001 - 2003; [Acceso el 10 de febrero de 2011]. Disponible en: [www.dannone.com](http://www.dannone.com)
11. Davidson P. M, Juneja V. K, Branen J. K. Antimicrobial Agents. En: Food additives. New York: Marcel Dekker, Inc. 2002 (2<sup>a</sup> ed. revised and expanded) 1-50.

12. Egan H, Kirk R, Sawyer R. Análisis Químico de Alimentos de Pearson. Mexico: Editorial Continental S.A. de C.V. 1993 (5ª reimpression).
13. Farnworth Edward R. Handbook of Fermented Functional Foods. 2ª Edición. Taylor and Francis Group, LLC. Estados Unidos. 2008. Capitulo 4.
14. Farnworth E.R. Kefir -- a complex probiotic. Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods. [Revista en línea] 2006 [Acceso el 15 de mayo de 2011]; 2 (1): [1 - 17]. Disponible en: <http://www.longecity.org/forum/topic/20433-kefir-a-complex-probiotic/>
15. Feng P, Weagant S.D, Grant M.A. BMA: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual [manual en línea]. 1998 (8ª ed.); Rev. A. Disponible en: <http://www.fda.gov/food/scienceresearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm>. [Consultado 06.03.2011].
16. Frequest J.L. Historia de la medicina. Instituto de Historia de la Medicina y de la Ciencia, Universidad de Valencia, España. Julio, 2009 [Acceso el 27 de febrero de 2011]  
Disponible en: <http://www.historiadelamedicina.org/pdfs/metchnikoff.pdf>
17. Garrote G. L, Abraham A. G., De Antoni G. L. Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie [Abstract en línea] 1997 Feb [Acceso el 20 de febrero de 2011] 30 (1): [77-84].  
Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643896901358>
18. Garrote G.L, Abraham A.G, De Antoni G.L. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. Journal of Food Protection [Abstract en línea] 2000 Mar [Acceso el 10 de febrero de 2011] 63(3): [364-9]. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716566>

19. Garrote G.L, Abraham A.G, De Antoni G.L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. Journal of Dairy Research [Abstract en línea] 2001[Acceso el 27 de febrero de 2011] 68 (04): [639-652].  
Disponible en:  
<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=100585>
20. Garrote G.L, Abraham A.G, De Antoni G.L. Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. En: Mozzi F. Raya, R.R. Vignolo G.M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. 1ª ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing [Libro en línea] 2010 [Acceso el 27 de febrero de 2011] p. 327-336.  
Disponible en:  
[http://books.google.com/books?id=FfnMwn5irp8C&pg=PA327&dq=kefir&hl=en&ei=6GCKTMVTwrvyBv\\_z-#v=onepage&q=kefir&f=false](http://books.google.com/books?id=FfnMwn5irp8C&pg=PA327&dq=kefir&hl=en&ei=6GCKTMVTwrvyBv_z-#v=onepage&q=kefir&f=false)
21. Goršek A, Tramšek M. Quantitative Examination of Process Parameters during Kefir Grain Biomass Production. International Journal of Chemical Reactor Engineering [Revista en línea] 2007 [Acceso el 2 de febrero de 2011] 5: [1-10] Disponible en:  
[http://www.bepress.com/cgi/viewcontent.cgi?context=ijcre&article=1409&date=&mt=MTMxMzQ0MDE1Nw==&access\\_ok\\_form=Continue](http://www.bepress.com/cgi/viewcontent.cgi?context=ijcre&article=1409&date=&mt=MTMxMzQ0MDE1Nw==&access_ok_form=Continue)
22. Grupo Noriega editores. Introducción a la tecnología de alimentos. México, D.F.: Editorial Limusa, S.A, de C.V., 2003 (2ª ed.) pág. 16 [Acceso el 20 de enero de 2012] disponible en:  
[http://books.google.com.sv/books?id=V2lqmVapJWkC&pg=PA16&dq=clasificacion+de+las+bacterias+lacticas&hl=es&sa=X&ei=P4ZOT8LuO4jzggfA8\\_XAAg&ved=0CD4Q6AEwAg#v=onepage&q=clasificacion%20de%20las%20bacterias%20lacticas&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=V2lqmVapJWkC&pg=PA16&dq=clasificacion+de+las+bacterias+lacticas&hl=es&sa=X&ei=P4ZOT8LuO4jzggfA8_XAAg&ved=0CD4Q6AEwAg#v=onepage&q=clasificacion%20de%20las%20bacterias%20lacticas&f=false)

23. Guzel-Seydim Z, Kok-Tas T, Ertekin-Filiz B, Seydim A.C. Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains. Journal Dairy Science. [Revista en línea] 2011 Mar [Acceso el 10 de febrero de 2011] 94 (3): [1239-42]. Disponible en:  
<http://es.scribd.com/doc/52644325/biomass-increase-in-kefir-grains>
24. Hernández A, Alfaro I, Arrieta R. Microbiología industrial [Libro en línea]. Costa Rica: Editorial EUNED; 2003 [Acceso 2 de febrero de 2011].  
Disponible en:  
[http://books.google.com.sv/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&dq=Microbiolog%C3%ADa+industrial&hl=es&ei=Miq\\_Tv-IGeTC0AHm88CUCQ&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCqQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&dq=Microbiolog%C3%ADa+industrial&hl=es&ei=Miq_Tv-IGeTC0AHm88CUCQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCqQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false)
25. Horwitz W. Editor. Official Methods of Analysis of AOAC International. Vol. 2. 17<sup>th</sup> ed. USA: AOAC International; 2000.
26. Lawson John, Madrigal José L., Erjavec John. Estrategias Experimentales para el mejoramiento de la Calidad en la Industria. Grupo Editorial Iberoamericana S.A de C.V. México D.F.1992.
27. Leches fermentadas – especificaciones. Especificación Técnica Cubana. Oficina Nacional de Normalización NC-TS 457:2007. [Acceso el 20 de febrero de 2011].  
Disponible en:  
<http://www.ica.edu.cu/Normas/Alimentos/Leche/NC%20TS%20457.%20Leches%20fermentadas.%20Especific.pdf>
28. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de

prueba. Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003. Diario Oficial de la Federación (12/09/2003). [Acceso el 15 de mayo de 2011]. Disponible en: [http://www.cednna.oaxaca.gob.mx/pdf/normatividad/Reglas\\_div/rd8.pdf](http://www.cednna.oaxaca.gob.mx/pdf/normatividad/Reglas_div/rd8.pdf)

29. Leite R.K, Gaudino L.R, Tavares J.C, Evangelista J, Schneedorf J.M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International Journal of Antimicrobial Agents* [Abstract en línea] 2005 [Acceso 26 de febrero de 2011] 25: [404–408].  
Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15848295>
30. León Peláez A. Kéfir un alimento probiótico a costo cero. En: *Jornadas Iberoamericanas Malnutrición y probióticos. Interacción de los probióticos sobre el estado nutricional y de salud de la población.* Guatemala; Centro de formación de la cooperación española en la antigua Guatemala; 2010
31. López J, Ochoa A, Santoyo G, Anaya J, Medina E, Martínez M, et al. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* [Revista en línea] 2008 [Acceso el 20 de enero de 2012] 39(3): 49-57.  
Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/579/57911110007.pdf>
32. Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología* [Abstract en línea] 2006 [Acceso 10 de febrero de 2011] 23 (2): [67-74] Disponible en: [http://kefir.it/symbiotic\\_yeasts.pdf](http://kefir.it/symbiotic_yeasts.pdf)
33. Luquet F.M. coordinador. *Leche y Productos Lácteos Vaca – Oveja – Cabra.* Vol. 2. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, S.A.; 1993.
34. Maturin L, Peeler J.T. BAM: Aerobic Plate Count. *Bacteriological Analytical Manual* [manual en línea] 1998 [Acceso el 06 de marzo de 2011]. (8ª ed.); Rev. A.

Disponible en:

<http://www.fda.gov/food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/Bacteriologica/AnalyticalManualBAM/default.htm>.

35. Ministerio de Salud. Boletín integrado de indicadores en salud 2009. El Salvador: MINSAL; 2009 [Acceso el 10 de agosto de 2011]. Disponible en: [http://www.salud.gob.sv/archivos/pdf/Boletin\\_de\\_indicadores\\_del\\_Sistema\\_Nacional\\_de\\_Salud\\_2009.pdf](http://www.salud.gob.sv/archivos/pdf/Boletin_de_indicadores_del_Sistema_Nacional_de_Salud_2009.pdf)
36. Montgomery, Douglas C., Runger, George C. Probabilidad y Estadística aplicadas a la Ingeniería. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A de C.V. México, DF. 1996.
37. Norma del Codex para leches fermentadas CODEX STAN 243-2003. [Acceso el 20 de febrero de 2011]. Disponible en: [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS\\_243s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS_243s.pdf) -
38. Norma General del Codex para el uso de Términos Lecheros. Codex Standard 206-1999. [Acceso el 20 de febrero de 2011]. Disponible en: [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS\\_243s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS_243s.pdf)-
39. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Informe del Grupo de Trabajo Conjunto FAO/OMS; 2006. Estudios FAO alimentación y nutrición: 85 [Acceso el 20 de febrero de 2011]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>
40. Organización Mundial de Gastroenterología. Guías prácticas: Probióticos y Prebióticos. 1998; 3-19. [Acceso el 27 de febrero de 2011]. Disponible en: [http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19\\_probioticos\\_prebioticos\\_es.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19_probioticos_prebioticos_es.pdf)

41. Papapostolou H, Bosnea L.A, Koutinas A.A, Kanellaki M. Fermentation efficiency of thermally dried kefir. *Bioresource Technology* [Abstract en línea] 2008 Oct. [Acceso 2 de febrero de 2011] 99 (15): [6949-6956]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18291639>
42. Preparar el kéfir no es un misterio. *Hoy*. Lunes 5 de septiembre de 2005; Interés general: 13. La Plata, argentina [Acceso el 10 de febrero de 2011]. Disponible en: [pdf.diariohoy.net/2005/09/05/pdf/13-c.pdf](http://pdf.diariohoy.net/2005/09/05/pdf/13-c.pdf)
43. Productos lácteos. Leche de vaca pasteurizada y ultrapasteurizada. (primera actualización). Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.0.2:06 *Diario Oficial*, n° 380 (17/07/2008) [Acceso el 19 de abril de 2011]. Disponible en: <http://www.infoq.org.sv/dbnormas/NSO%2067.01.02.06.pdf>
44. Ramírez J. Danilo. *Conceptos estadísticos básicos para el análisis, interpretación e inferencias en resultados cuantitativos en Ciencias Químicas* [Trabajo de graduación]. S.S, El Salvador, C.A. 1999
45. Reglamento técnico MERCOSUR de identidad y calidad de leches fermentadas. [Acceso el 20 de febrero de 2011]. Disponible en: [http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas\\_web/Resoluciones/ES/Res\\_047\\_097\\_.PDF](http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_047_097_.PDF).
46. Rivera M. Diarrea y desnutrición: una preocupante combinación. *El Litoral.com*. Martes 31 de agosto de 2010; salud. [Acceso el 15 de agosto de 2011]. Disponible en: <http://www.ellitoral.com/index.php/diarios/2010/08/31/salud/SALUD-01.html>
47. Robert Johnson. *Estadística elemental*. Grupo Editorial Iberoamericana S.A de C.V. México D.F. 1991.



48. Romero S. R, Mestres J. Productos Lácteos Tecnología [Libro en línea]. Edición UPC; 2004 [Acceso el 20 de febrero de 2011]. Disponible en:  
[http://books.google.com/sv/books?id=HUugK6Ep\\_JkC&printsec=frontcover&dq=Productos+L%C3%A1cteos.+Tecnolog%C3%ADa&hl=es&ei=VjU\\_TqeUOYP30gGU09jIAw&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/sv/books?id=HUugK6Ep_JkC&printsec=frontcover&dq=Productos+L%C3%A1cteos.+Tecnolog%C3%ADa&hl=es&ei=VjU_TqeUOYP30gGU09jIAw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false)
49. Sanz Y. Collado M, C. Dalmau J. probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Acta Pediátrica Española [Revista en línea] 2003 [Acceso el 04 de Agosto de 2011] 61(9): [58-64]. Disponible en:  
<http://www.gastroinf.com/SecciNutri/PROBIOTICO.pdf>
50. Serrano R. Pobreza y malos hábitos llevan a la desnutrición. El Diario de Hoy.com. Martes 21 de noviembre de 2006; El País [Acceso el 10 de febrero de 2011].  
Disponible en:  
<http://www.elsalvador.com/noticias/2006/11/21/elpais/pais1.asp>
51. Servicio Nacional de Estudios Territoriales. Informe del perfil climatológico de El Salvador del año 2011. El salvador: SNET; 2011 [Acceso el 20 de enero de 2012].  
Disponible en:  
<http://www.snet.gob.sv/ver/meteorologia/clima/perfiles+climatologicos/>
52. Shavit E. Renewed Interest in Kefir, the Ancient Elixir of Longevity. Fungi [Revista en línea] 2008 [Acceso el 15 de Mayo de 2011] 1 (2): [14-18].  
Disponible en:  
[http://www.fungimag.com/summer-08-articles/7\\_Medicinal\\_Final\\_lo-res.pdf](http://www.fungimag.com/summer-08-articles/7_Medicinal_Final_lo-res.pdf)
53. Tamime A. editor. Fermented Milks [Libro en línea]. Ayr, UK: Blackwell publishing; Julio 2006 [Acceso el 15 de febrero de 2011]. Disponible en:

[http://books.google.com.sv/books?id=3E\\_NqM3QrVAC&pg=PR17&dq=Fermented+Milks.+Dairy+Science+and+Technology+Consultant&hl=es&ei=Azc\\_TtyYO6av0AG85smGBA&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q=Fermented%20Milks.%20Dairy%20Science%20and%20Technology%20Consultant&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=3E_NqM3QrVAC&pg=PR17&dq=Fermented+Milks.+Dairy+Science+and+Technology+Consultant&hl=es&ei=Azc_TtyYO6av0AG85smGBA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q=Fermented%20Milks.%20Dairy%20Science%20and%20Technology%20Consultant&f=false)

54. Varga J, Kocsubé S, Péteri Z, Vágvölgyi C, Tóth B. Chemical, Physical and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses in Humans and Animals. *Toxins* 2010 [Revista en línea] 2010 [Acceso 26 de febrero de 2011] 2: [1718-1750]. Disponible en:  
<http://www.mdpi.com/2072-6651/2/7/1718/pdf>
55. Vorob'eva A.I, Vitovskaya G.A, Shashkov A.S, Knirel' Yu. A, Paramonov N.A. Structure of glucogalactan from kefir grains. *Journal Bioorganicheskaya Khimiya* [Abstract en línea] 1990 [Acceso 06 de Marzo de 2011] 16 (6) [808-815]. Disponible en: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19920453177.html>
56. Witthuhn R.C, Schoeman T, Britz T.J. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal* [Revista en línea] 2005 [acceso 03 de febrero de 2011] 15 (4): [383-389]. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694604002134>
57. <http://es.scribd.com/doc/43388271/0-EI-CULTIVO-de-KEFIR-de-LECHE-Articulo-Completo-Mejoras-Beneficios-Tratamientos> [Acceso el 22 de febrero de 2011] El cultivo de kéfir de Leche.
58. <http://www.google.com.sv/url?sa=t&source=web&cd=10&ved=0CFEQFjAJ&url=http%3A%2F%2Fwww.chefuri.com%2Fusuarios%2Fdownload%2Fkefir%2Fkefirleche.rtf&rct=j&q=biomasa%20del%20k%C3%A9fir&ei=wnhkTaz8N>

IP7lwfgsZG7Bg&usg=AFQjCNGsdB98spWcE2qUNHwvBOAI5ieQtw [Acceso el 10 de febrero de 2011]. El Kéfir de leche.

59. <http://www.apoloybaco.com/comensalconocias0109.htm> [Acceso el 20 de febrero de 2011]. El Kéfir de leche.

60. <http://www.kefir.co.kr/eng/kefiran.php> [Acceso el 03 de marzo de 2011].  
Composition of kefir.

61. <http://decs.es/anatomia/celulas-caco-2.2/>

62. [http://www.natureduca.com/med\\_fitoterap\\_intestino2.php](http://www.natureduca.com/med_fitoterap_intestino2.php)

## **GLOSARIO**

## GLOSARIO (4, 22, 31, 39, 47, 61, 62)

- **Bacterias ácido lácticas homofermentativas:** bacterias que poseen las enzimas aldolasa y hexosa-isomerasa, pero carecen de la fosfoacetolasa. Usan la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para la producción de dos moléculas de ácido láctico por cada molécula de glucosa consumida. Sólo forman pequeñas cantidades de otros metabolitos diferentes del ácido láctico el cual representa del 90 al 97% de la lactosa fermentada.
  
- **Bacterias ácido lácticas heterofermentativas:** grupo de bacterias que contiene la enzima fosfoacetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa-isomerasa; así que en lugar de seguir la vía EMP para la degradación de la glucosa, utilizan las vías del hexosa monofosfato o la de la pentosa. La producción de ácido es más débil; además del ácido láctico se forman otros ácidos, sustancias diversas y CO<sub>2</sub>.
  
- **Bacteriemia nosocomial:** es aquella infección que un paciente adquiere durante un ingreso hospitalario.
  
- **Bacteriocinas:** son péptidos biológicamente activos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos.
  
- **Células de adenocarcinoma de colon humano:** son células capaces de expresar elementos de diferenciación característicos de las células intestinales maduras, como los enterocitos. Estas células son herramientas valiosas para estudios In vitro relacionados con la función y diferenciación de las células intestinales.

- **Disbacteriosis intestinal:** es una alteración de la flora intestinal por diversas causas, generalmente una colitis o la ingesta de medicamentos antibióticos. La desaparición o alteración de los microorganismos intestinales es un problema para las funciones digestivas, ya que son fundamentales e insustituibles en ese proceso. Así, puede ocurrir que determinadas bacterias que conforman la flora intestinal queden mermadas por efecto de un antibiótico ingerido por vía oral, permitiendo que otras más fuertes predominen; o que ciertas bacterias incluso desaparezcan alterando la función digestiva.
  
- **Grados de libertad:** es el número de cantidades independientes que se necesitan en su cálculo, menos el número de restricciones que ligan a las observaciones y el estadístico. Es decir, normalmente  $n-1$ .
  
- **Mínima diferencia significativa (LSD):** es la diferencia entre dos medias, basadas en la prueba  $t$  de Student, empleando el valor de la varianza del error.
  
- **Prebiótico:** son ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una de las especies de bacterias que están ya establecidas en el colon, o de un número limitado de ellas, y por consiguiente mejoran de hecho la salud del huésped.

## **ANEXOS**

## **ANEXO N° 1**

**Composición de la leche fermentada con gránulos de kéfir y  
comparación nutricional de la leche fermentada con gránulos de  
kéfir con otras leches**



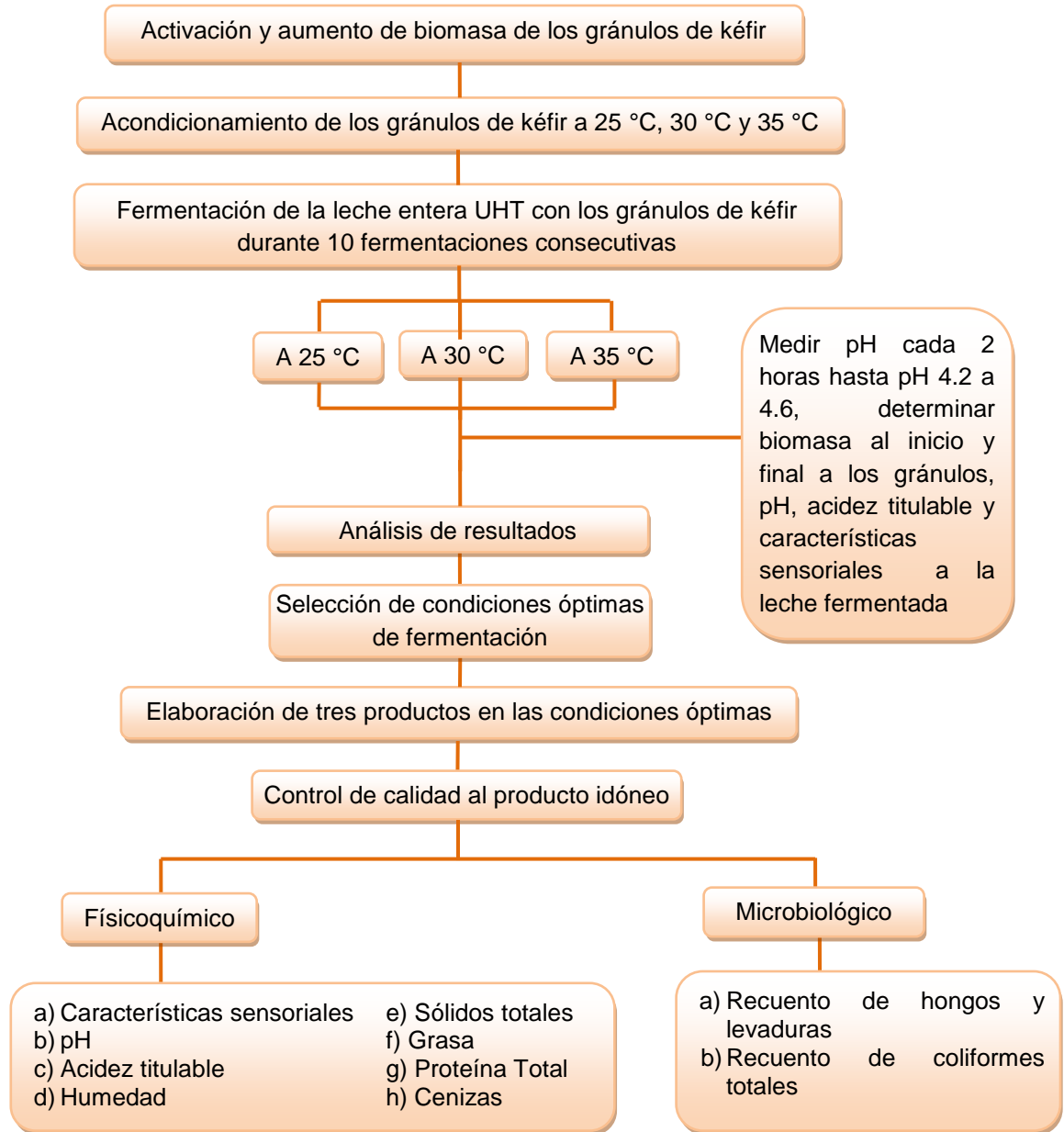
**Cuadro N° 3.** Composición de la leche fermentada con gránulos de kéfir <sup>(8)</sup>.

Componente	Concentración/Comentarios
Grasa	Depende de la fuente (vaca, oveja, cabra, yegua) y el contenido de grasa (rica en grasa, baja en grasa, sin grasa) de la leche utilizada.
Proteínas	Contenido: 3 a 3.4%
Lactosa	El consumo parcial de la lactosa (alrededor del 25%) por las bacterias ácido lácticas y levaduras. Contenido: 2 a 3.5%.
Acido láctico	Formado por las bacterias ácido lácticas, principalmente la forma L (+). Contenido: 0,6 a 1%.
Otros ácidos orgánicos	Acidos acético, fórmico, propiónico, succínico, pirúvico, isobutírico, caproico, cáprico, caprílico, láurico. Que consiste en menos del 1% de la leche fermentada.
Etanol	Producido por las levaduras. Contenido: 0.01 a 0.1% utilizando cultivos, 0.03 a 1.8% utilizando gránulos.
CO <sub>2</sub>	Producido por levaduras y bacterias ácido lácticas heterofermentativas. Proporciona la carbonatación típica asociada con kéfir.
Compuestos aromáticos	Acetaldehído, diacetil, acetoína los cuales contribuyen al aroma del kéfir.
Vitaminas	Aumento de la concentración de vitaminas en un 20% observado en tiamina (sólo en el kéfir de leche de oveja), piridoxina (kéfir de fuentes de la leche de oveja, cabra y yegua), ácido fólico (kéfir de todas las fuentes de leche).

**Tabla N° 23.** Comparación nutricional de la leche fermentada con gránulos de kéfir con otras leches <sup>(57)</sup>.

	<b>Leche fermentada con gránulos de kéfir</b>	<b>Leche entera</b>	<b>Leche descremada</b>	<b>Yogurt</b>
Kcal	61	64	35	61
Proteínas (g)	3.3	3.3	3.5	3.3
Lípidos (g)	3.5	3.5	0.1	3.5
Glúcidos (g)	4	4.8	4.9	4
Agua (g)	87.5	87.5	90.58	7.5
Colesterol (mg)	11	11	-	11
Sodio (mg)	48	48	50	48
Potasio (mg)	157	157	163	157
Calcio (mg)	120	120	125	120
Fosforo (mg)	92	92	96	92
Magnesio (mg)	12	12	12	11
Hierro (mg)	0.1	0.1	0.1	0.1
Vit. A (mg)	31	31	1	31
Vit. E (mg)	0.2	0.2	-	0.2
Vit. B1 (mg)	0.03	0.03	0.03	0.03
Vit. B2 (mg)	0.18	0.18	0.19	0.18
Vit. B3 (mg)	0.1	0.1	0.1	0.1
Vit. B6 (mg)	0.05	0.05	0.05	0.05
Vit. C (mg)	1	1	1	1

## ANEXO N° 2

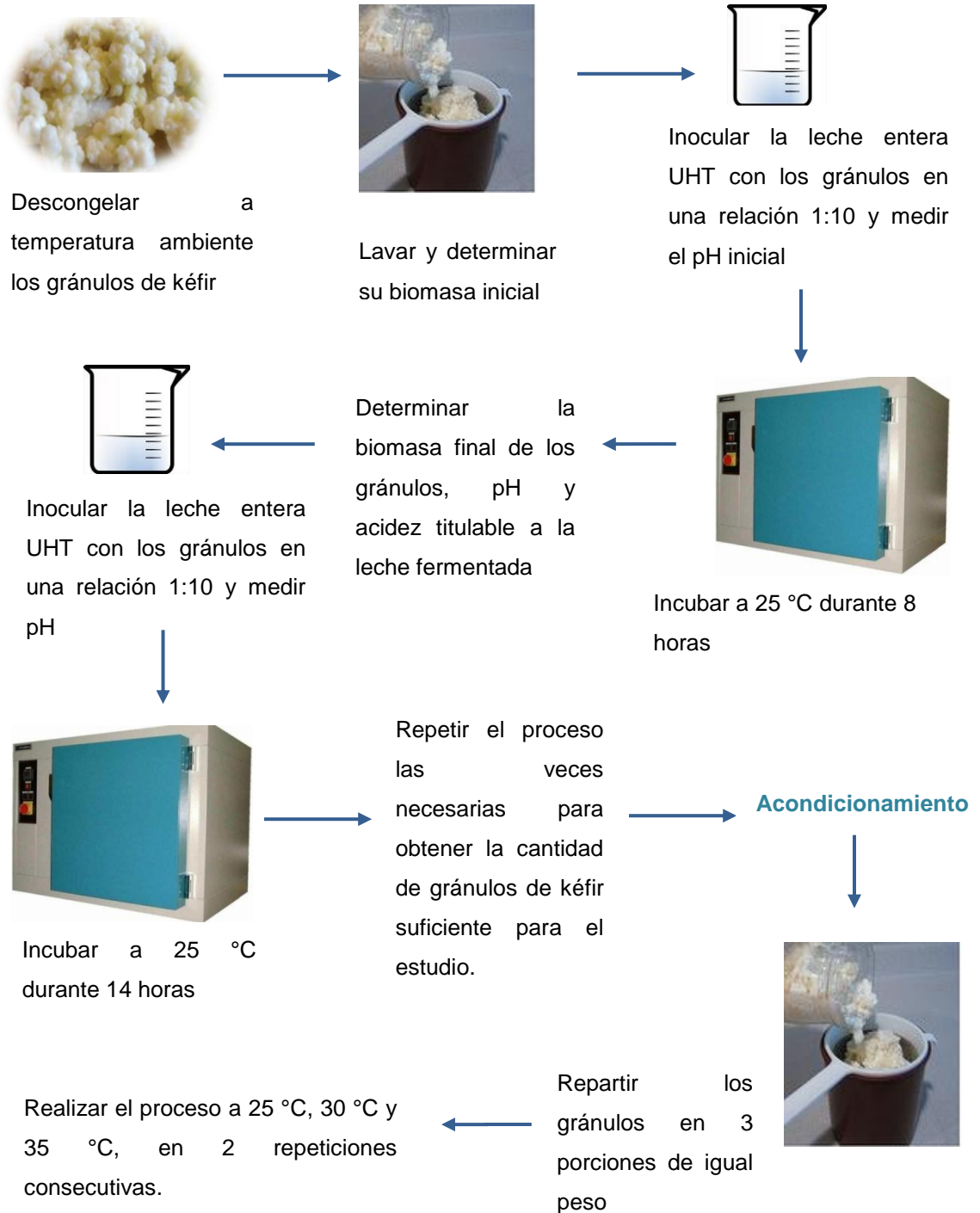


**Fig. N° 16.** Flujograma de la estandarización del proceso de fermentación de la leche entera UHT con gránulos de kéfir.

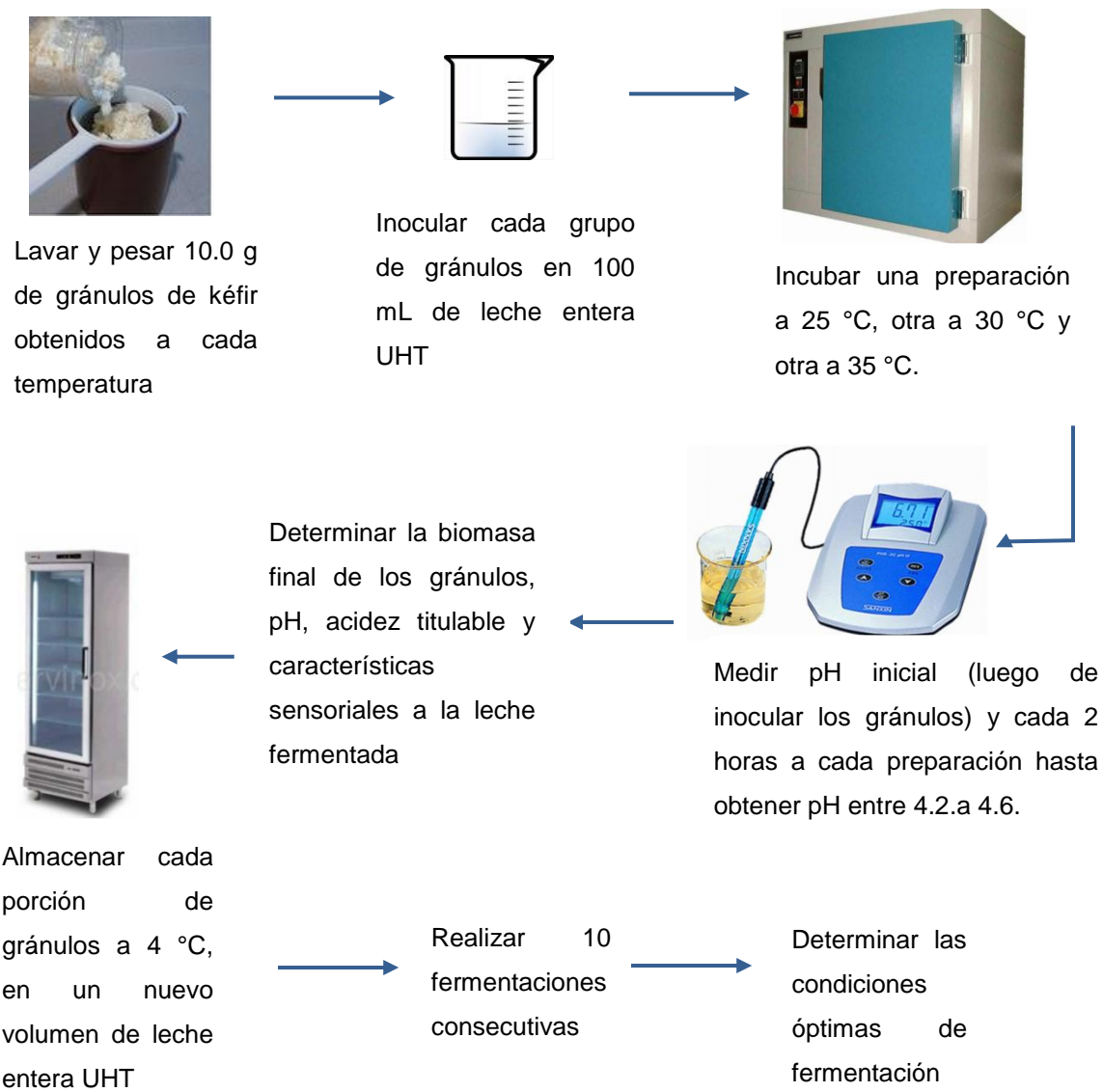
### **ANEXO N° 3**

**Esquemas de los procedimientos de activación, producción y acondicionamiento de los gránulos de kéfir, y de la fermentación de la leche entera UHT con gránulos de kéfir**

### Activación y aumento de biomasa



**Fig. N° 17.** Procedimiento para la activación, aumento de biomasa y acondicionamiento de los gránulos de kéfir <sup>(19, 21)</sup>.



**Fig. N° 18.** Fermentación de la leche entera UHT con los gránulos de kéfir a 25°C, 30 °C y 35 °C.

## **ANEXO N° 4**

### **Procedimientos de análisis fisicoquímicos y microbiológicos**



Filtrar los gránulos de kéfir en un tamiz plástico, lavar con agua desmineralizada estéril y escurrir.

Pesar en balanza analítica.

**Fig. N° 19.** Procedimiento para la determinación de biomasa <sup>(21)</sup>.

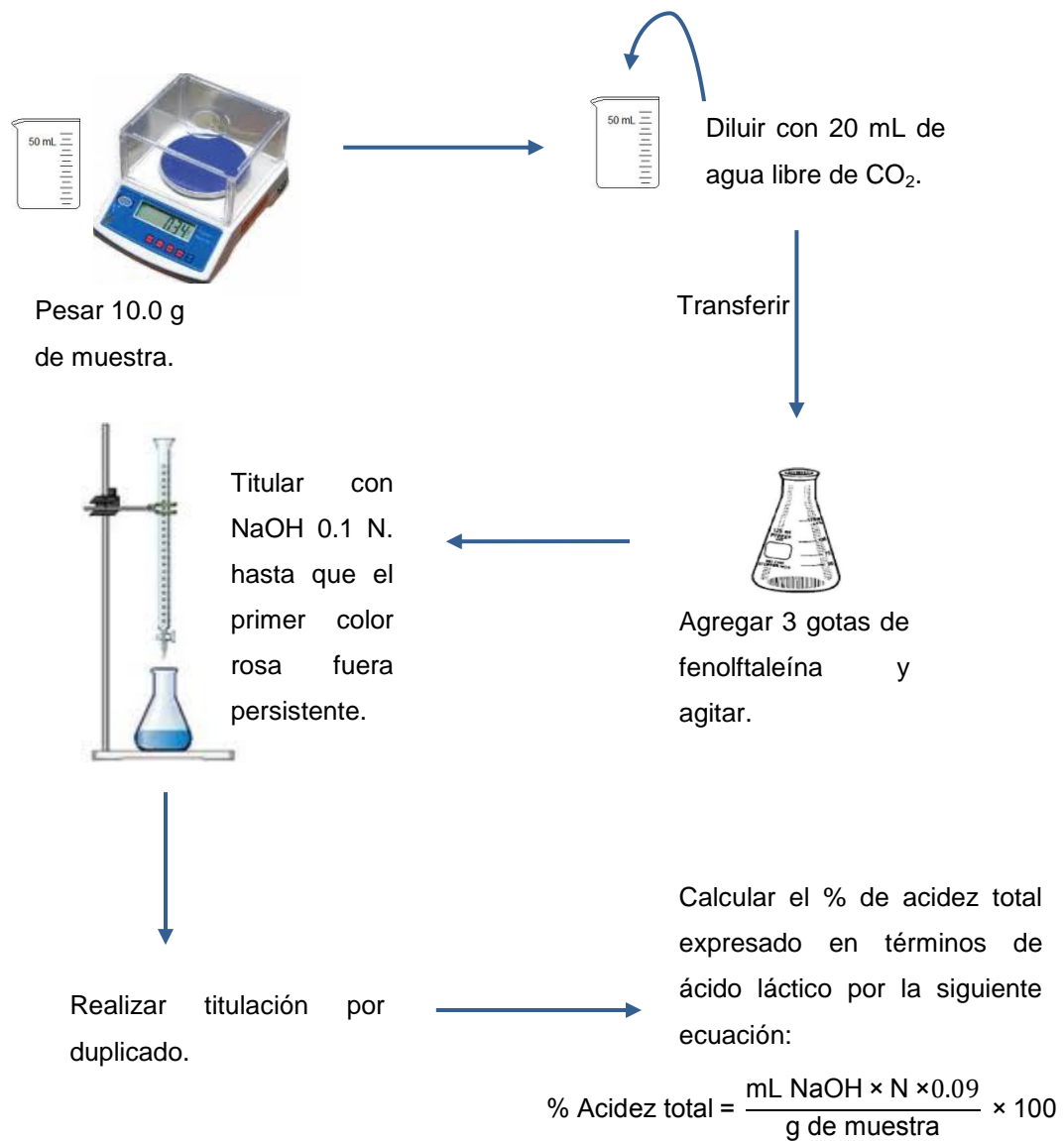


Calibrar el pH-metro, con compensación automática de temperatura, utilizando buffer pH 4 y buffer pH 7.

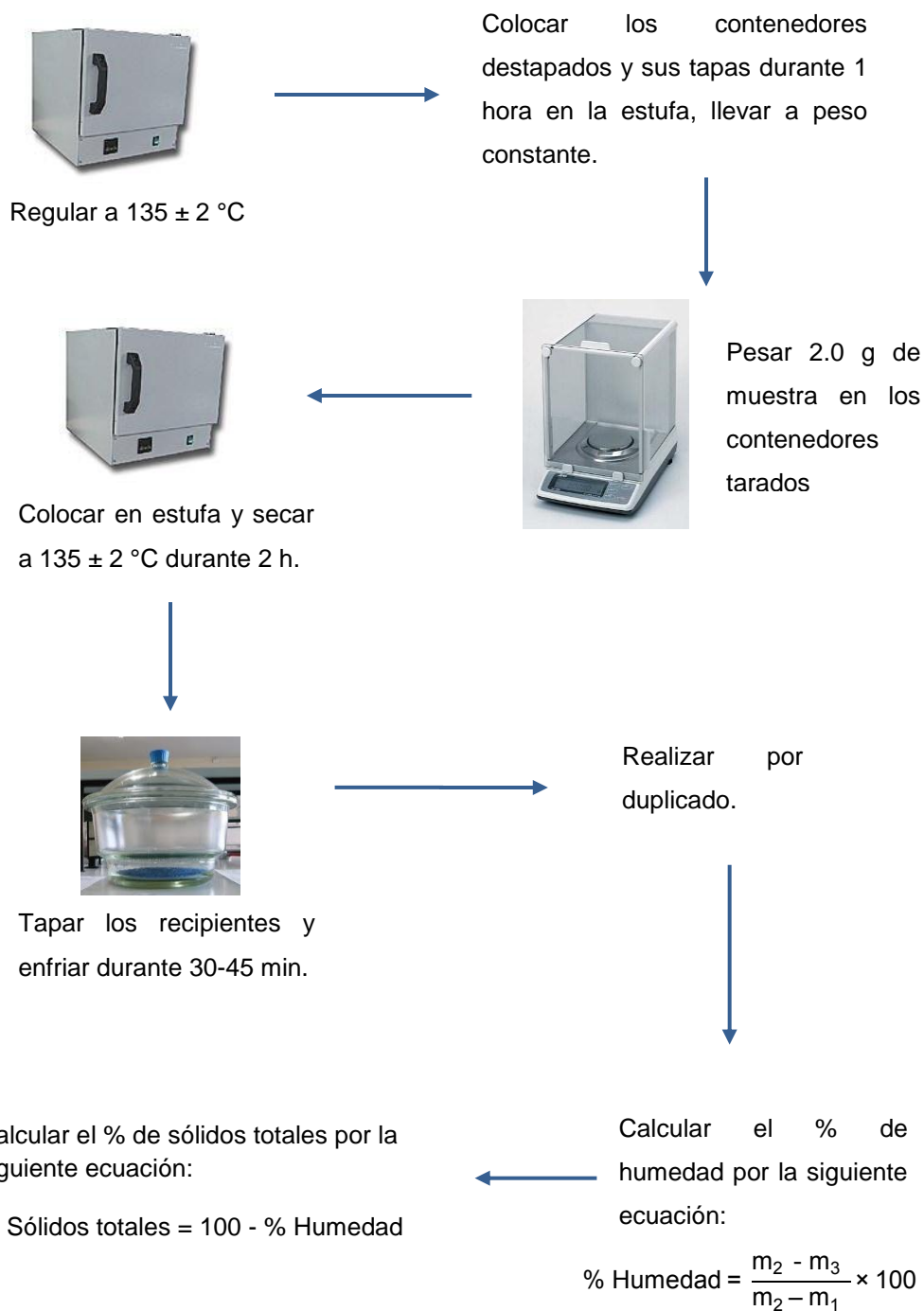
Agitar con agitador de vidrio estéril cada preparación y la leche fermentada obtenida de cada proceso y medir el pH sumergiendo el electrodo directamente en éstas.

**Fig. N° 20.** Procedimiento para la medición de pH.

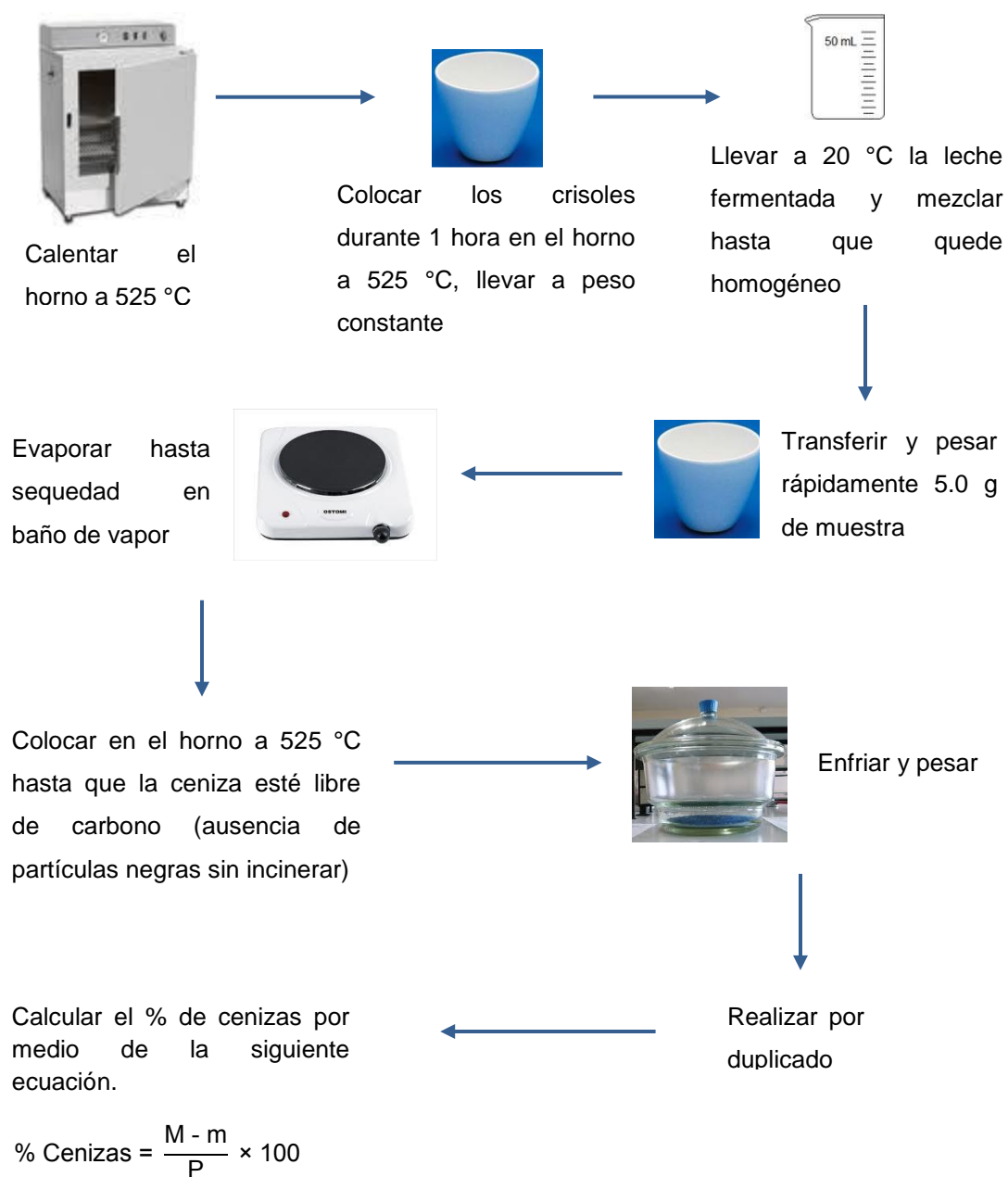




**Fig. N° 21.** Procedimiento para la determinación de acidez titulable<sup>(25)</sup>.



**Fig. N° 22.** Procedimiento para la determinación de humedad y sólidos totales (25, 28).

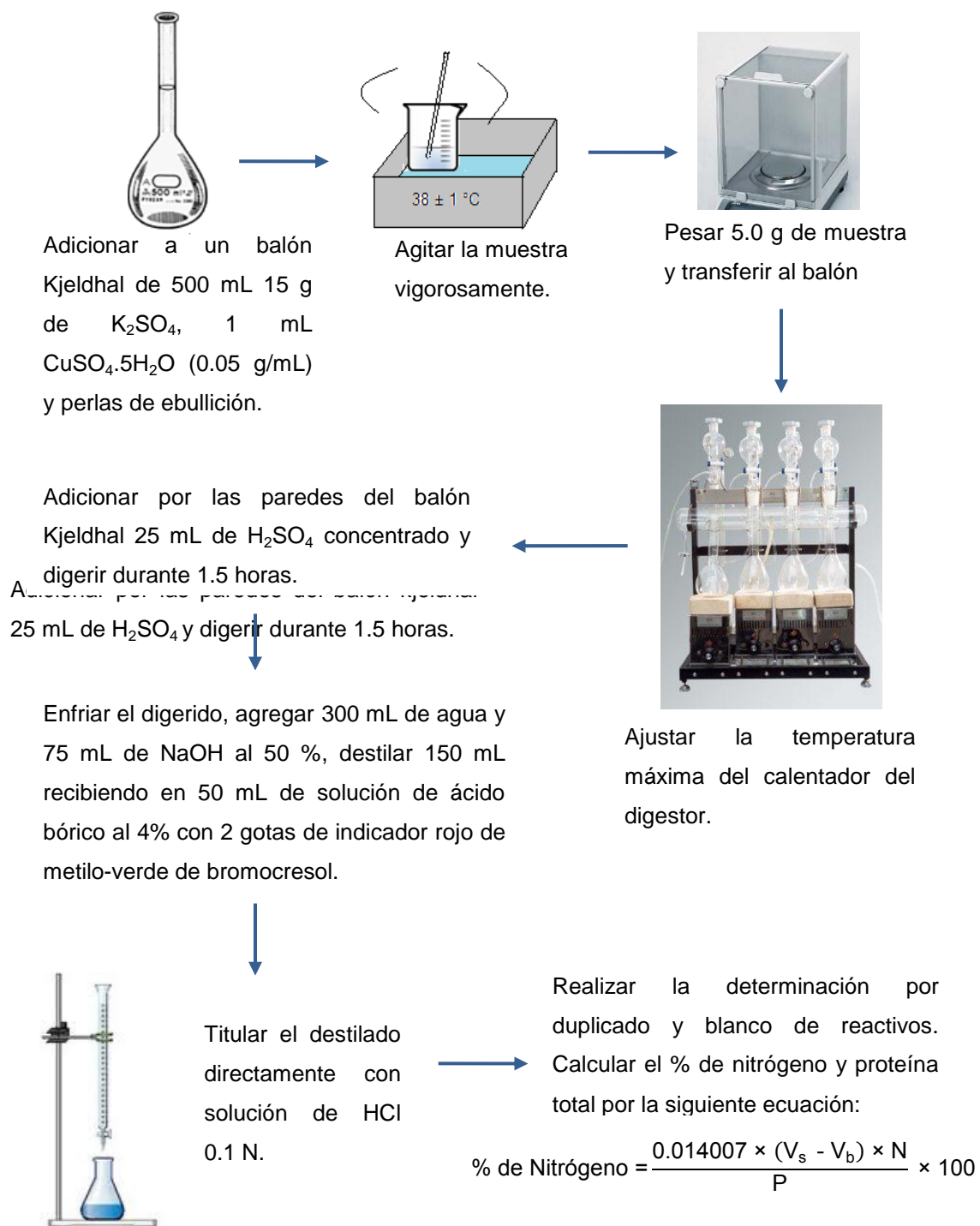


**Fig. N° 23.** Procedimiento para la determinación de cenizas (12, 25).



$$\% \text{ Grasa} = \frac{M - m}{P} \times 100$$

**Fig. N° 24.** Procedimiento para la determinación de grasa <sup>(25)</sup>.



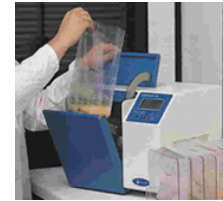
**Fig. N° 25.** Procedimiento para la determinación de proteína total <sup>(25)</sup>.



Pesar asépticamente 10 g de muestra, transferir a un frasco con 90 mL de buffer fosfato pH 7.2.



Transferir la dilución a una bolsa plástica estéril y mezclar en el Stomacher a 200 rpm por 7 segundos. Esta es la dilución  $10^{-1}$



10 mL



10 mL



Dilución  $10^{-1}$

Homogenizar



Dilución  $10^{-2}$

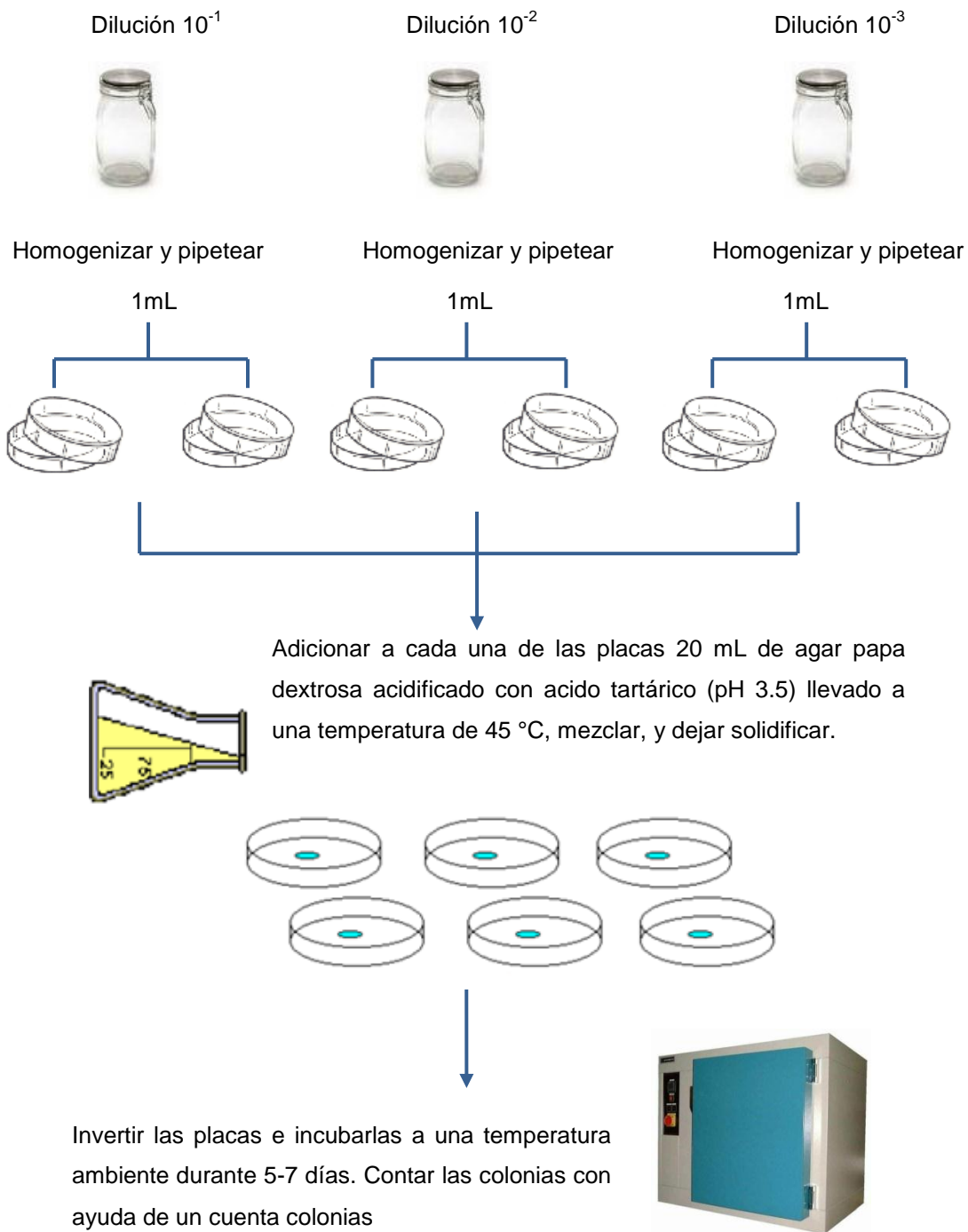
Homogenizar



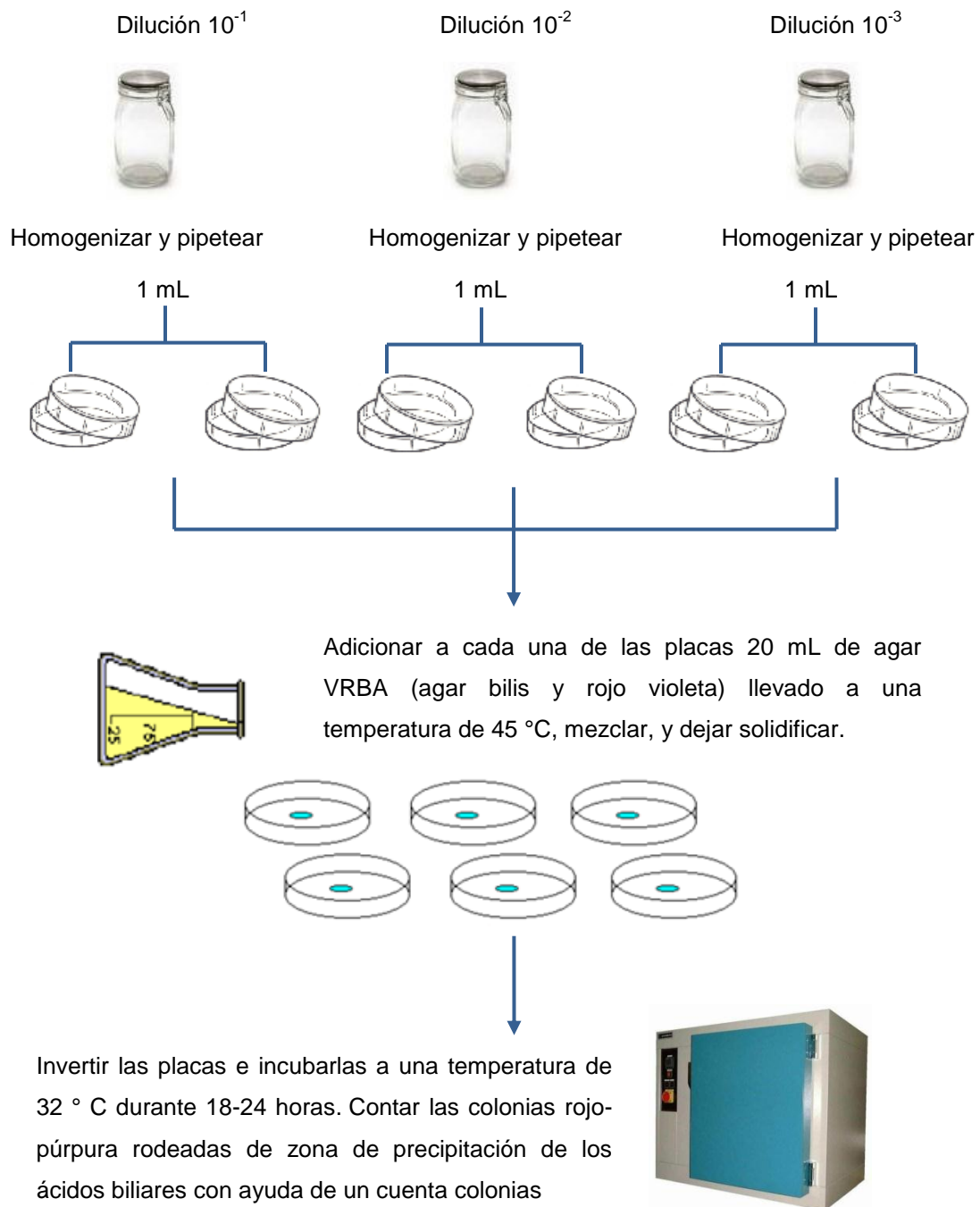
Dilución  $10^{-3}$

Homogenizar

**Fig. N° 26.** Procedimiento para la preparación de la muestra <sup>(34)</sup>.

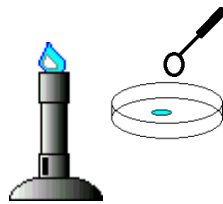


**Fig. N° 27.** Procedimiento para la determinación de hongos y levaduras <sup>(34)</sup>.



**Fig. N° 28.** Procedimiento para la determinación de coliformes totales <sup>(15)</sup>.

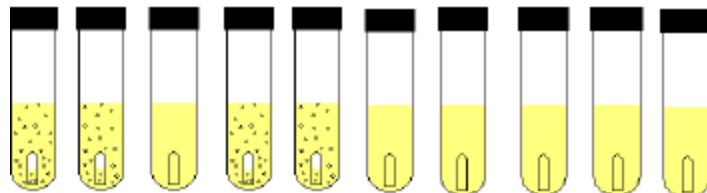




Recoger por lo menos 10 colonias sospechosas y trasladar cada una a un tubo de caldo BGLB (Lactosa Verde Brillante Bilis 2%).



Incubar los tubos a 35 ° C. Examinar a las 24 y a las 48 horas para la producción de gas.



Determinar el número de coliformes por gramo multiplicando el número de colonias sospechosas por ciento confirmado en BGLB por el factor de dilución.

**Fig. N° 29.** Procedimiento para prueba confirmatoria de coliformes totales <sup>(15)</sup>.

**ANEXO N° 5**  
**Cálculos estadísticos**

## Cálculos estadísticos del aumento de biomasa (4, 26, 47)

- Cálculo de los grados de libertad.

$$gl_{(\text{Temperatura})} = c - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$gl_{(\text{Total})} = N - 1 = 28 - 1 = 27$$

$$gl_{(\text{Error})} = N - c = 28 - 3 = 25$$

Donde:

gl= Grados de libertad.

N = Total de repeticiones.

c = Número de niveles.

- Calculo de la suma de cuadrados.

$$SC_{(\text{Total})} = \sum (X^2) - \frac{(\sum x)^2}{N}$$

Donde:

SC<sub>(Total)</sub> = Suma de cuadrados total.

$\sum(X^2)$  = Sumatoria de cada repetición al cuadrado de cada nivel.

$\sum x$  = Sumatoria de cada repetición de cada nivel.

N = Total de repeticiones.

$$\sum (X^2) = 9.41^2 + 10.16^2 + \dots + 11.60^2 = 3182.0832$$

$$\sum x = 9.41 + 10.16 + \dots + 11.60 = 286.74$$

$$SC_{(\text{Total})} = 3182.0832 - \frac{(286.74)^2}{28} = 246.0850$$

$$SC_{(\text{Factor})} = \left( \frac{C_1^2}{k_1} + \frac{C_2^2}{k_2} + \frac{C_3^2}{k_3} \right) - \frac{(\sum x)^2}{N}$$

Donde:

$SC_{(\text{Factor})}$  = Suma de cuadrados del factor.

$C_i$  = Total de cada nivel.

$k_i$  = Número de repeticiones en cada nivel.

$\sum x$  = Sumatoria de las repeticiones de cada nivel.

$N$  = Total de repeticiones.

$$SC_{(\text{Temperatura})} = \left( \frac{(125.39)^2}{10} + \frac{(85.14)^2}{9} + \frac{(76.21)^2}{9} \right) - \frac{(286.74)^2}{28} = 86.9942$$

$$SC_{(\text{Error})} = \sum (X^2) - \left( \frac{C_1^2}{k_1} + \frac{C_2^2}{k_2} + \frac{C_3^2}{k_3} \right)$$

Donde:

$SC_{(\text{Error})}$  = Suma de cuadrados del error.

$\sum (X^2)$  = Sumatoria de cada repetición al cuadrado de cada nivel.

$C_i$  = Total de cada nivel.

$k_i$  = Número de repeticiones en cada nivel.

$$SC_{(\text{Error})} = 3182.0832 - \left( \frac{(125.39)^2}{10} + \frac{(85.14)^2}{9} + \frac{(76.21)^2}{9} \right) = 159.0910$$

- Calculo de la media de cuadrados

$$MC_{(\text{Factor})} = \frac{SC_{(\text{Factor})}}{gl_{(\text{Factor})}}$$

Donde:

$MC_{(\text{Factor})}$  = Media de cuadrados del factor.

$SC_{(\text{Factor})}$  = Suma de cuadrados del factor.

$gl_{(\text{Factor})}$  = Grados de libertad del factor.

$$MC_{(\text{Temperatura})} = \frac{86.9942}{2} = 43.4971$$

$$MC_{(\text{Error})} = \frac{SC_{(\text{Error})}}{gl_{(\text{Error})}}$$

Donde:

$MC_{(\text{Error})}$  = Media de cuadrados del error.

$SC_{(\text{Error})}$  = Suma de cuadrados del error.

$gl_{(\text{Error})}$  = Grados de libertad del error.

$$CM_{(\text{Error})} = \frac{159.0910}{25} = 6.3636$$

- Calculo del valor  $F$

$$F = \frac{43.4971}{6.3636} = 6.84$$

- Calculo de los límites de confianza al 95% para la media de aumento de biomasa utilizando el LSD.

Este es un ejemplo para comparar la temperatura de 25 °C y 30 °C utilizando la tabla  $t$ -Student (Ver valores críticos de la distribución  $t$  en anexo N° 9)

$$LSD = 2.0595 \sqrt{6.3636 \left( \frac{1}{10} + \frac{1}{9} \right)} = 2.387089919$$

Se calculó la diferencia entre cada par de medias y se comparo con el valor LSD obtenido anteriormente

$$12.549 - 9.46444 = 3.08456 > 2.387089919$$

Debido a que el producto de la resta anterior es mayor que el límite, existe diferencia significativa entre 25 °C y 30 °C, para verificar este resultado se calculó un intervalo de confianza:

$$\begin{aligned}\bar{X}_{25\text{ °C}} - \bar{X}_{30\text{ °C}} &= \text{Diferencia} \\ 12.549 - 9.46444 &= 3.08456\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Diferencia} + \text{LSD} &= \text{Limite superior} \\ 3.08456 + 2.38708 &= 5.47164\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Diferencia} - \text{LSD} &= \text{Limite inferior} \\ 3.08456 - 2.38708 &= 0.69748\end{aligned}$$

De 0.69748 a 5.47164, no se incluye el valor cero, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, de que las medias de aumento de biomasa para las temperaturas de 25 °C, 30 °C y 35 °C son iguales.

- Cálculo del intervalo de confianza al 95.0% para la media utilizando la distribución Z.

Este es un ejemplo para la media de aumento de biomasa a la temperatura de 25 °C:

$$\text{Límite inferior} = 12.549 + 1.96 \frac{2.27989}{\sqrt{10}} = 13.9620$$

$$\text{Límite superior} = 12.549 - 1.96 \frac{2.27989}{\sqrt{10}} = 11.1359$$

El programa *STATGRAPHICS* proporcionó los valores de estos límites para cada media utilizando todos los decimales, por eso no se obtuvieron exactos con esta ecuación.

## Cálculos de la medición de pH

- Cálculo de los grados de libertad.

$$gl_{(\text{Temperatura de fermentación A})} = a - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$gl_{(\text{Tiempo de fermentación B})} = b - 1 = 4 - 1 = 3$$

$$gl_{(AB)} = (a - 1) (b - 1) = (3 - 1) (4 - 1) = 6$$

$$gl_{(\text{Total})} = N - 1 = 120 - 1 = 119$$

$$gl_{(\text{Error})} = ab (n - 1) = 3 \times 4 (10 - 1) = 108$$

Donde:

$gl_{(\text{Factor A})}$  = Grados de libertad del factor A.

$gl_{(\text{Factor B})}$  = Grados de libertad del factor B.

$gl_{(AB)}$  = Grados de libertad de la interacción entre el factor A y el factor B.

$gl_{(\text{Total})}$  = Grados de libertad total.

$gl_{(\text{Error})}$  = Grados de libertad del error.

a = Número de niveles del factor A.

b = Número de niveles del factor B.

n = Número de repeticiones que hay por nivel.

N = Total de repeticiones.

- Cálculos de los valores de pH utilizando las ecuaciones de pH

Este es un ejemplo para calcular el pH a las 6 horas de fermentación utilizando la ecuación 1 de la tabla N° 14, para la temperatura de fermentación de 30 °C:

$$y = - 0.4925x + 6.505$$

Dónde:

Y = Corresponde al pH.

X = Corresponde a la hora de fermentación.

$$y = - 0.4925 (6) + 6.505$$

$$y = 3.55$$

El procedimiento anterior se realizó para todas las ecuaciones de la tabla N° 14.

- Calculo de la suma de cuadrados.

$$SC_{(Total)} = \sum (X^2) - \frac{(\sum x)^2}{N}$$

$$\begin{aligned} \sum (X^2) &= (6.46)^2 + \dots + (6.72)^2 + \dots + (5.60)^2 + \dots + (5.80)^2 + \dots + (4.78)^2 + \dots + (5.04)^2 + \dots \\ &+ (4.37)^2 + \dots + (4.54)^2 + \dots + (2.39)^2 = 3247.88 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum x &= 6.46 + \dots + 6.72 + \dots + 5.60 + \dots + 5.80 + \dots + 4.78 + \dots + 5.04 + \dots + 4.37 + \dots \\ &+ 4.54 + \dots + 2.39 = 608.97 \end{aligned}$$

$$SC_{(Total)} = 3247.88 - \frac{(608.97)^2}{120} = 157.5240$$

$$SC_{(Temperatura A)} = \left( \frac{C_1^2 + C_2^2 + C_3^2}{bn} \right) - \frac{(\sum x)^2}{N}$$

Donde:

SC<sub>A</sub> = Suma de cuadrados del factor A

C<sub>i</sub> = Total de cada nivel.



b = Número de niveles del factor B.

N = Número de repeticiones que hay por nivel.

$\sum x$  = Sumatoria de cada repetición de cada nivel.

N = Total de repeticiones.

$$SC_{(A)} = \left( \frac{(216.55)^2 + (201.9)^2 + (190.52)^2}{40} \right) - \frac{(608.97)^2}{120} = 8.5203$$

$$SC_{(\text{Tiempo de fermentación B})} = \left( \frac{C_1^2 + C_2^2 + C_3^2 + C_4^2}{an} \right) - \frac{(\sum x)^2}{N}$$

Donde:

$SC_B$  = Suma de cuadrados del factor B

$C_i$  = Total de cada nivel.

a = Número de niveles del factor A.

n = Número de repeticiones que hay por nivel.

$\sum x$  = Sumatoria de cada repetición de cada nivel.

N = Total de repeticiones.

$$SC_{(B)} = \left( \frac{(195.25)^2 + (167.94)^2 + (135.78)^2 + (110.00)^2}{30} \right) - \frac{(608.97)^2}{120} = 138.3940$$

$$SC_{AB} = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y^2_{ij}}{n} - \frac{(\sum x)^2}{N} - SC_A - SC_B$$

Donde:

$SC_{AB}$  = Suma de cuadrados de la interacción de A y B.

$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y^2_{ij}$  = Sumatoria de cada una de las repeticiones por cada nivel.

n = Número de repeticiones que hay por nivel.

a = Número de niveles del factor A.

b = Número de niveles del factor B.

$\sum x$  = Sumatoria de cada repetición de cada nivel.

N = Total de repeticiones.

SC<sub>A</sub> = Suma de cuadrados del factor A

SC<sub>B</sub> = Suma de cuadrados del factor B

$$SC_{(AB)} = \frac{(65.04)^2 + (57.94)^2 + (49.06)^2 + (44.51)^2 + (65.03)^2 + (56.52)^2 + (44.94)^2 + (35.41)^2 + (65.18)^2 + (53.48)^2 + (41.78)^2 + (30.08)^2}{10} - \frac{(608.97)^2}{120}$$
$$- 8.51 - 138.4 = 5.8398$$

$$SC_{(Error)} = SC_{(Total)} - SC_{(A)} - SC_{(B)} - SC_{(AB)}$$

Donde:

SC<sub>(Error)</sub> = Suma de cuadrados del error.

SC<sub>(Total)</sub> = Suma de cuadrados total.

SC<sub>A</sub> = Suma de cuadrados del factor A

SC<sub>B</sub> = Suma de cuadrados del factor B

SC<sub>AB</sub> = Suma de cuadrados de la interacción de A y B.

$$SC_{(Error)} = 157.52 - 8.52 - 138.4 - 5.83 = 4.77$$

- Calculo de la media de cuadrados

$$MC_{(Error)} = \frac{SC_{(Error)}}{gl_{(Error)}} = \frac{4.77}{108} = 0.0441667$$

$$MC_{(Temperatura A)} = \frac{SC_{(Temperatura)}}{gl_{(Temperatura)}} = \frac{8.51}{2} = 4.2601$$

$$MC_{(Tiempo de fermentación B)} = \frac{SC_{(Tiempo de fermentación)}}{gl_{(Tiempo de fermentación)}} = \frac{138.4}{3} = 46.1314$$

$$MC_{(AB)} = \frac{SC_{(AB)}}{gl_{(AB)}} = \frac{5.83}{6} = 0.9733$$

Donde:

$MC_{(AB)}$  = Media de cuadrados de la interacción de A y B.

$SC_{AB}$  = Suma de cuadrados de la interacción de A y B.

$gl_{(AB)}$  = Grados de libertad de la interacción de A y B.

$$MC_{(Error)} = \frac{4.77}{108} = 0.0441667$$

- Calculo del valor  $F$

$$F_A = \frac{4.2601}{0.04416} = 96.46$$

$$F_B = \frac{46.1314}{0.04416} = 1044.49$$

$$F_{(AB)} = \frac{0.9733}{0.04416} = 22.04$$

## ANEXO N° 6

### Clima de El Salvador según zonas térmicas

**Cuadro N° 3.** Clima de El Salvador según zonas térmicas durante el año 2011<sub>(51)</sub>.

<b>Zonas térmicas según la altura en metros sobre el nivel medio del mar</b>	<b>Departamentos</b>	<b>Promedio de temperatura</b>
De 0 - 800 msnm	Ahuachapán, Cabañas, La Unión, San Miguel, San Salvador, San Vicente, Santa Ana, Sonsonate, La Paz.	Disminuyendo con la altura de 27 a 22 °C en las planicies costeras y de 28 a 22 °C en las planicies internas.
De 800 - 1200 msnm	Usulután, Chalatenango, La Libertad, Cuscatlán.	Disminuyendo con la altura de 22 a 20 °C en las planicies altas y de 21 a 19 °C en las faldas de montañas.
De 1200 - 2700 msnm	Morazán	De 20 a 16 °C en planicies altas y valles, de 21 a 19 °C en faldas de montañas y de 16 a 10 °C en valles y hondonadas sobre 1,800 metros.

**ANEXO N° 7**

**Hojas de control de procesos**



# CENSALUD

Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

Universidad de El Salvador



Universidad de El Salvador

Facultad de Química y Farmacia

Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)

Laboratorio de Microbiología

Fecha de análisis: \_\_\_\_\_

**Cuadro N° 5.** Registro del análisis sensorial de las leches fermentadas.

<b>Característica organoléptica</b>	<b>Especificación</b>	<b>Resultado</b>	<b>Cumple con la NC-TS 457:2007</b>
Aspecto	Color uniforme. Blanco si es natural. Homogéneo.		
Olor	Típico a producto lácteo fermentado, similar a la levadura fresca		
Sabor	Típico a producto lácteo fermentado, ligeramente ácido o agrio		
Textura	Consistencia viscosa o cremosa		



# CENSALUD

Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

Universidad de El Salvador



Universidad de El Salvador

Facultad de Química y Farmacia

Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)

Laboratorio de Microbiología

Fecha de análisis: \_\_\_\_\_

Temperatura: \_\_\_\_\_ °C

**Tabla N° 24.** Registro de fermentación realizado durante el proceso de activación, aumento y acondicionamiento de los gránulos de kéfir.

	Tiempo de fermentación			
	8 horas de fermentación		14 horas de fermentación	
	Hora de inicio:	Hora final:	Hora de inicio:	Hora final:
<b>Determinación</b>				
Biomasa (g)				
pH				
Acidez titulable (%)				



# CENSALUD

Centro de Investigación y Desarrollo en Salud  
Universidad de El Salvador



Universidad de El Salvador  
Facultad de Química y Farmacia

Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)

Laboratorio de Microbiología

Fecha de análisis: \_\_\_\_\_

**Tabla N° 25.** Registro de fermentación de la leche entera UHT con los gránulos de kéfir a 25 °C, 30 °C y 35 °C durante 10 fermentaciones consecutivas.

Determinación	Tiempo de fermentación (horas)	Temperatura de fermentación		
		25 °C	30 °C	35 °C
Biomasa (g)	Inicial			
	Final			
pH	0			
	2			
	4			
	6			
Acidez titulable (%)	Final			





# CENSALUD

Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

Universidad de El Salvador



Universidad de El Salvador

Facultad de Química y Farmacia

Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)

Laboratorio de Microbiología

Fecha de análisis: \_\_\_\_\_

**Tabla N° 26.** Registro de fermentación realizado durante la obtención de los 3 productos idóneos a 25 °C

Determinación	Tiempo de fermentación (horas)	Número de réplicas		
		1	2	3
Biomasa (g)	0			
	6			
pH	0			
	2			
	4			
	6			
Acidez titulable (%)	Final			



## ANEXO N° 8

**Tabla N° 28.** Cociente de rechazo “Q” en el nivel de confianza del 90 % <sup>(44)</sup>.

Numero de observaciones	Q
3	0.94
4	0.76
5	0.64
6	0.56
7	0.51
8	0.47
9	0.44
10	0.41
A	0.00

**ANEXO N° 9**

**Valores críticos de la distribución  $F$**

**Tabla N° 29.** Valores críticos de  $F$  para los cuales el área bajo la curva a la derecha es igual a 0.05 <sup>(47)</sup>.

$U_2 \backslash U_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242
2	18.5	19.00	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91
$\infty$	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83

$U_1$  = Grados de libertad en el numerador

$U_2$  = Grados de libertad en el denominador

**Tabla N° 29.** Continuación.

$U_2 \backslash U_1$	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$
1	244	246	248	249	250	251	252	253	254
2	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.50
3	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8-53
4	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.37
6	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.41
12	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73
25	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
30	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25
$\infty$	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

$U_1$  = Grados de libertad en el numerador

$U_2$  = Grados de libertad en el denominador

**ANEXO N° 10**

**Valores críticos de la distribución  $t$ -Student**

**Tabla N° 30.** Valores críticos de la distribución *t*-Student <sup>(36)</sup>.

<b>Grados de Libertad</b>	<b>0.25</b>	<b>0.1</b>	<b>0.05</b>	<b>0.025</b>	<b>0.01</b>	<b>0.005</b>
<b>1</b>	1.0000	3.0777	6.3137	12.7062	31.8210	63.6559
<b>2</b>	0.8165	1.8856	2.9200	4.3027	6.9645	9.9250
<b>3</b>	0.7649	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408
<b>4</b>	0.7407	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469	4.6041
<b>5</b>	0.7267	1.4759	2.0150	2.5706	3.3649	4.0321
<b>6</b>	0.7176	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074
<b>7</b>	0.7111	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979	3.4995
<b>8</b>	0.7064	1.3968	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554
<b>9</b>	0.7027	1.3830	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498
<b>10</b>	0.6998	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693
<b>11</b>	0.6974	1.3634	1.7959	2.2010	2.7181	3.1058
<b>12</b>	0.6955	1.3562	1.7823	2.1788	2.6810	3.0545
<b>13</b>	0.6938	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123
<b>14</b>	0.6924	1.3450	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768
<b>15</b>	0.6912	1.3406	1.7531	2.1315	2.6025	2.9467
<b>16</b>	0.6901	1.3368	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208
<b>17</b>	0.6892	1.3334	1.7396	2.1098	2.5669	2.8982
<b>18</b>	0.6884	1.3304	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784
<b>19</b>	0.6876	1.3277	1.7291	2.0930	2.5395	2.8609
<b>20</b>	0.6870	1.3253	1.7247	2.0860	2.5280	2.8453
<b>21</b>	0.6864	1.3232	1.7207	2.0796	2.5176	2.8314
<b>22</b>	0.6858	1.3212	1.7171	2.0739	2.5083	2.8188
<b>23</b>	0.6853	1.3195	1.7139	2.0687	2.4999	2.8073
<b>24</b>	0.6848	1.3178	1.7109	2.0639	2.4922	2.7970
<b>25</b>	0.6844	1.3163	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874
<b>26</b>	0.6840	1.3150	1.7056	2.0555	2.4786	2.7787
<b>27</b>	0.6837	1.3137	1.7033	2.0518	2.4727	2.7707
<b>28</b>	0.6834	1.3125	1.7011	2.0484	2.4671	2.7633
<b>29</b>	0.6830	1.3114	1.6991	2.0452	2.4620	2.7564
<b>30</b>	0.6828	1.3104	1.6973	2.0423	2.4573	2.7500



**Tabla N° 30. Continuación.**

<b>40</b>	0.6807	1.3031	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045
<b>50</b>	0.6794	1.2987	1.6759	2.0086	2.4033	2.6778
<b>60</b>	0.6786	1.2958	1.6706	2.0003	2.3901	2.6603
<b>70</b>	0.6780	1.2938	1.6669	1.9944	2.3808	2.6479
<b>80</b>	0.6776	1.2922	1.6641	1.9901	2.3739	2.6387
<b>90</b>	0.6772	1.2910	1.6620	1.9867	2.3685	2.6316
<b>100</b>	0.6770	1.2901	1.6602	1.9840	2.3642	2.6259
$\infty$	0.6745	1.2816	1.6449	1.9600	2.3263	2.5758

## **ANEXO N° 11**

**Valores críticos de la distribución normal estándar acumulada**

**Tabla N° 31. Valores críticos de la distribución normal estándar acumulada <sup>(36)</sup>.**

<b><math>z_0</math></b>	<b>0,05</b>	<b>0,06</b>	<b>0,07</b>	<b>0,08</b>	<b>0,09</b>	<b><math>z_0</math></b>
<b>0,0</b>	0,5199	0,5239	0,5279	0,5319	0,5359	<b>0,0</b>
<b>0,1</b>	0,5596	0,5636	0,5675	0,5714	0,5753	<b>0,1</b>
<b>0,2</b>	0,5987	0,6026	0,6064	0,6103	0,6141	<b>0,2</b>
<b>0,3</b>	0,6368	0,6406	0,6443	0,6480	0,6517	<b>0,3</b>
<b>0,4</b>	0,6736	0,6772	0,6808	0,6844	0,6879	<b>0,4</b>
<b>0,5</b>	0,7088	0,7123	0,7157	0,7190	0,7224	<b>0,5</b>
<b>0,6</b>	0,7422	0,7454	0,7486	0,7517	0,7549	<b>0,6</b>
<b>0,7</b>	0,7734	0,7764	0,7794	0,7823	0,7852	<b>0,7</b>
<b>0,8</b>	0,8023	0,8051	0,8078	0,8106	0,8133	<b>0,8</b>
<b>0,9</b>	0,8289	0,8315	0,8340	0,8365	0,8389	<b>0,9</b>
<b>1,0</b>	0,8531	0,8554	0,8577	0,8599	0,8621	<b>1,0</b>
<b>1,1</b>	0,8749	0,8770	0,8790	0,8810	0,8830	<b>1,1</b>
<b>1,2</b>	0,8944	0,8962	0,8980	0,8997	0,9015	<b>1,2</b>
<b>1,3</b>	0,9115	0,9131	0,9147	0,9162	0,9177	<b>1,3</b>
<b>1,4</b>	0,9265	0,9279	0,9292	0,9306	0,9319	<b>1,4</b>
<b>1,5</b>	0,9394	0,9406	0,9418	0,9429	0,9441	<b>1,5</b>
<b>1,6</b>	0,9505	0,9515	0,9525	0,9535	0,9545	<b>1,6</b>
<b>1,7</b>	0,9599	0,9608	0,9616	0,9625	0,9633	<b>1,7</b>
<b>1,8</b>	0,9678	0,9686	0,9693	0,9699	0,9706	<b>1,8</b>
<b>1,9</b>	0,9744	0,9750	0,9756	0,9761	0,9767	<b>1,9</b>
<b>2,0</b>	0,9798	0,9803	0,9808	0,9812	0,9817	<b>2,0</b>
<b>2,1</b>	0,9842	0,9846	0,9850	0,9854	0,9857	<b>2,1</b>
<b>2,2</b>	0,9878	0,9881	0,9884	0,9887	0,9890	<b>2,2</b>
<b>2,3</b>	0,9906	0,9909	0,9911	0,9913	0,9916	<b>2,3</b>
<b>2,4</b>	0,9929	0,9931	0,9932	0,9934	0,9936	<b>2,4</b>
<b>2,5</b>	0,9946	0,9948	0,9949	0,9951	0,9952	<b>2,5</b>
<b>2,6</b>	0,9960	0,9961	0,9962	0,9963	0,9964	<b>2,6</b>
<b>2,7</b>	0,9970	0,9971	0,9972	0,9973	0,9974	<b>2,7</b>
<b>2,8</b>	0,9978	0,9979	0,9979	0,9980	0,9981	<b>2,8</b>
<b>2,9</b>	0,9984	0,9985	0,9985	0,9986	0,9986	<b>2,9</b>

**Tabla N° 31. Continuación.**

<b><math>z_0</math></b>	<b>0,05</b>	<b>0,06</b>	<b>0,07</b>	<b>0,08</b>	<b>0,09</b>	<b><math>z_0</math></b>
<b>3,0</b>	0,99886	0,99889	0,99893	0,99896	0,99900	<b>3,0</b>
<b>3,1</b>	0,99918	0,99921	0,99924	0,99926	0,99929	<b>3,1</b>
<b>3,2</b>	0,99942	0,99944	0,99946	0,99948	0,99950	<b>3,2</b>
<b>3,3</b>	0,99960	0,99961	0,99962	0,99964	0,99965	<b>3,3</b>
<b>3,4</b>	0,99972	0,99973	0,99974	0,99975	0,99976	<b>3,4</b>
<b>3,5</b>	0,99981	0,99981	0,99982	0,99983	0,99983	<b>3,5</b>
<b>3,6</b>	0,99987	0,99987	0,99988	0,99988	0,99989	<b>3,6</b>
<b>3,7</b>	0,99991	0,99992	0,99992	0,99992	0,99992	<b>3,7</b>
<b>3,8</b>	0,99994	0,99994	0,99995	0,99995	0,99995	<b>3,8</b>
<b>3,9</b>	0,99996	0,99996	0,99996	0,99997	0,99997	<b>3,9</b>

## ANEXO N° 12

### Certificado de análisis de proteína total y grasa realizado a las muestras elaboradas en las condiciones óptimas de fermentación



**FUNDACIÓN SALVADOREÑA PARA INVESTIGACIONES DEL CAFÉ  
LABORATORIO DE SERVICIOS ANALÍTICOS  
SECCIÓN ESPECIALES**



INFORME No. : 187

PROPIETARIO: Ana Guadalupe Santos  
DIRECCIÓN: Lourdes Colón #2  
TELÉFONO: 7667-2372

FECHAS	
RECEPCIÓN:	17/10/2011
ANÁLISIS:	19/10/2011
EMISIÓN:	28/10/2011

#### RESULTADOS DE ANÁLISIS EN MUESTRAS DE ESPECIALES

TIPO DE ANÁLISIS	EC-1135	EC-1136	EC-1137
	TIPO DE MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	TIPO DE MUESTRA
	LECHE 111011-A	LECHE 111011-B	LECHE 111011-C
PROTEINA	2.93%	3.0%	3.13%
GRASA Y ACEITES	3.54%	3.42%	3.58%

**NOTA ACLARATORIA:** El resultado del análisis corresponde a la muestra enviada por usted (es) a este Laboratorio. El muestreo es responsabilidad del usuario. El Laboratorio no autoriza la reproducción parcial sin la debida autorización por escrito.

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**

<b>NITRÓGENO TOTAL: Factor de Proteína (NX6.38)</b>	Método 991.20, Nitrogen (Total) in Milk, Kjeldahl Methods, Referencia A.O.A.C 33.2.11, 16ª. Edición.
<b>GRASA:</b>	Método 905.02, Fat in Milk, Roese-Gottlieb Method, Referencia A.O.A.C 33.2.25, 16ª. Edición.



  
Lic. Reina Elizabeth Funes de Cruz  
Coordinador del Laboratorio de Servicios Analíticos  
El Café es Vida

  
Lic. Ana Delmy Figueroa  
Técnico Analista

## **ANEXO N° 13**

### **Material y equipo**

#### **Material**

- Agitadores de vidrio
- Balones volumétricos de 50.0,1000.0 ml
- Balones Kjeldahl de 500 mL
- Beaker de 30,50,100,250, 400,600 mL
- Buretas de 10, 25 mL
- Embudo de vidrio tallo corto y largo
- Erlenmeyer de 125,250,500,1000 mL
- Frascos para diluciones
- Perlas de ebullición
- Pipeta de morh de 1.0 mL , 5.0 mL y 10.0 mL
- Pipetas volumétrica de 1.0 mL,5.0 mL y 10.0 mL
- Placas de petri
- Probetas de 10,25,50,100,500,1000 mL
- Tubos de ensayo con rosca de 10, 50 mL
- Tubos de ensayo con tapón de rosca de 100 mL
- Capsulas de porcelana con tapadera
- Asa metálica
- Capsulas de metal
- Espátulas
- Pinzas de extensión
- Pinzas de sostén
- Pinzas para crisol
- Soportes
- Cocina eléctrica
- Desecadores

- Gradillas para tubos de ensayo
- Guantes de asbesto
- Mechero Bunsen
- Pipeteadores
- Tamices plásticos

## **Equipo**

- Aparato de digestión y destilación Kjeldhal
- Autoclave (Sterillizer SN510)
- Balanza Analítica (COBOS AY220, capacidad máxima 220 g).
- Balanza Granataria (Sartorius BL 600, capacidad máxima 600 g)
- Baño María (BUNSEN serie BA)
- Baño de vapor
- Cabina de Flujo Laminar (TELSTAR MH-100)
- Centrifuga
- Estufa (TRADE Raypa)
- Hot Plate (P-SELECTA AGIMATIC-N)
- Incubadoras (P- SELECTA INCUBAT 80 L)
- pH metro (CRISON BASIC 20)
- Mufla (HOBERSAL 12-PR/200)
- Stomacher (Seward stomacher 400 circulator)
- Incubadora Refrigeradora de precisión (P-SELECTA HOT-COLD S 4000667)

## **ANEXO Nº 14**

### **Reactivos y Medios de Cultivo**

#### **Medios de cultivo**

- Agar VRBA (verde bilis y rojo violeta)
- Agar papa dextrosa
- Buffer Fosfato pH= 7.2
- Caldo BGLB (Lactosa Verde Brillante Bilis 2 %)

Nota: Se preparan de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

#### **Reactivos**

- Solución de hidróxido de sodio 0.1 N
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N
- Solución de Acido bórico al 4%
- Rojo de metilo
- Verde de bromocresol
- Solución de ácido tartárico
- Acido sulfúrico concentrado
- Buffer pH 7 y pH 4
- Sulfato de potasio
- Solución de fenolftaleína al 1%
- Solución de sulfato de cobre pentahidratado (0.05 g/mL)
- Alcohol isopropílico
- Alcohol etílico
- Hidróxido de amonio
- Éter de petróleo
- Agua desmineralizada estéril