

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



**FERMENTACION DE LECHE DESCREMADA  
UHT A PARTIR DE GRANULOS DE KEFIR**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR**

**JESSICA GRACIELA GARCIA TORRES  
ROSA CAROLINA HERNANDEZ DE BERMUDEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA**

**MARZO, 2015**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO.

**SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA.

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LIC. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO.

**SECRETARIO**

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ.

**DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION.**

**DIRECTORA GENERAL**

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo.

**TRIBUNAL CALIFICADOR**

**COORDINADORES DE AREA DE: MICROBIOLOGÍA**

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos.

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz.

**DOCENTES ASESORES**

Msc. Amy Elieth Morán Rodríguez.

Lic. Juan Agustín Cuadra Soto.

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradecemos primero a Dios nuestro Señor y a su madre la virgen María por habernos permitido estudiar y culminar nuestra carrera exitosamente, a nuestros padres por haber luchado por darnos el regalo del estudio, a cada uno de los maestros, maestras, laboratoristas e instructores que nos ayudaron en diferentes momentos para poder salir adelante.

Agradecemos a nuestros asesores de tesis MSc. Amy Elieth Moran por la paciencia que nos tuvo, por enseñarnos nuevas cosas y por dedicar parte de su tiempo para culminar nuestra tesis, al Lic. Juan Agustín Cuadra por toda la dedicación y ayuda que nos brindó tanto en material de apoyo como en conocimientos y por encontrar en ambos comprensión.

Agradecimientos especiales a MSc. Mirna Sorto, Ing. Néstor Planas, Lic. Danilo Ramírez, Lic. Jorge Alberto Carranza, MSc. Rocío Roano de Sandoval, Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo, MSc. María Evelin Sánchez de Ramos. Y MSc. Coralia Gonzáles de Díaz por su apoyo en el desarrollo de este trabajo de graduación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) por permitirnos utilizar sus instalaciones así como materiales y equipos que hicieron posible nuestro trabajo, al laboratorio de Bromatología y Análisis toxicológico y de Química Agrícola ambos de la facultad de Química y Farmacia por prestarnos sus instalaciones y materiales para realizar los diferentes análisis.

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar esta tesis primero que todo a Dios y a nuestra madre la Virgen María por haberme ayudado a estudiar la carrera y permitirme culminarla, a mis padres Antonio García y Sonia Torres por haberse esforzado y limitado muchas veces para darme los estudios y por el apoyo incondicional que recibí por su parte, a mis hermanos Jackelin, Carlos, William y Joey por apoyarme tanto moral como económicamente y por cada vez que me veían cansada elevaban mis ánimos, a mis abuelas Teresa Campos y Graciela Zelaya, a mis tías y primos por motivarme a ser una profesional, a mis amigas y amigos con los que compartí muchos momentos de estudio y alegría, que lograron hacer de mis años universitarios un recuerdo bueno e inolvidable.

A mi amada Alma Mater la Universidad De El Salvador por permitirme formarme no solo como profesional si no como persona, a los diferentes maestros y maestras que impartieron su conocimiento durante la carrera, especialmente a la Lic. Irma Vaquerano, Lic. Martha Ilda Luna, Rhina Toledo y Zenia Ivonne Arévalo que me enseñaron con su entusiasmo y dedicación a amar la profesión, así como también al Lic. Francisco Remberto Mixco por formarme en el área hospitalaria y enseñarme a pensar en grande, al Dr. Carlos Galdámez y la licenciada María Elisa Vivar porque ambos me brindaron su cariño y ayuda incondicional en todo momento y al lic. Alfredo Sol por motivarme a ser una mejor profesional. A mis asesores de tesis MSc. Amy Elieth Moran y Lic. Juan Agustín Cuadra por todo lo que hicieron por Carolina y por mí para salir adelante con la tesis, y a mi compañera de tesis Carolina gracias por la paciencia que me tuvo y por la dedicación al trabajo.

**Jessica Graciela García Torres**

## **DEDICATORIA**

Gracias Dios todo poderoso y a la Virgen María por sentir su presencia en las diferentes etapas de mi vida, por darme la sabiduría necesaria y permitir el haber llegado hasta este momento de mi formación profesional, a pesar de las adversidades, brindándome las fuerzas para seguir adelante .

A mi esposo Mauricio Bermúdez por apoyarme en todo momento, por sus palabras de motivación, por la paciencia a lo largo de esta carrera y por creer en mí. A mis hijas Helen y Sahily por ser mi inspiración, mi motivo de salir a delante, por impulsarme día a día a ser una mejor persona y una mejor madre, a mis padres Rhina Pérez y Guillermo Hernández por su apoyo incondicional, por sus oraciones, y sacrificios, por sus consejos, por guiarme por el buen camino, a mis hermanos Lourdes, Guillermo y Saúl por hacerme sentir que siempre contaba con ustedes, a mi segunda madre Zoila Umaña, por entregarse a mi familia, por ser mi mano derecha por sus sabios consejos, por ayudarme a crecer como persona.

A mis profesores quienes a lo largo de esta carrera me llenaron de sus conocimientos para formarme como profesional y como persona. A mis asesores de tesis MSc. Amy Moran y Lic. Juan Agustín Cuadra por sus conocimientos impartidos, su paciencia y dedicación en este trabajo, a mis amigos y amigas por brindarme su amistad y estar conmigo en los buenos y malos momentos a mi compañera de tesis Jessica García, por su amistad, su paciencia y comprensión y espíritu de superación.

Eternamente gracias.

**Rosa Carolina Hernández de Bermúdez.**

## INDICE

	<b>Pág.</b>
Resumen.	
Capítulo I	
1.0 Introducción.	xxi
Capítulo II	
2.0. Objetivos.	24
Capítulo III	
3.1. Alimentos funcionales.	26
3.2. Probióticos.	27
3.2.1. Historia del consumo de alimentos probióticos.	28
3.2.2. Bacterias Ácido Lácticas.	28
3.2.3. Mecanismo de acción de los probióticos.	29
3.2.4. Efectos de los probióticos sobre la salud.	29
3.2.4.1.Evidencia científica.	29
3.2.4.2.Prevencción de infecciones intestinales.	30
3.2.4.3.Fortalecimiento del sistema inmunológico.	31
3.3. Leche.	33
3.3.1. Clasificación de las leches según su contenido de grasa.	34
3.4. Leche fermentada.	34
3.4.1. Historia del consumo de alimentos lácteos fermentados.	35
3.4.2. Beneficios del consumo de leche fermentada.	36
3.4.3. Efectos sobre la salud del consumo de productos lácteos fermentados que contiene probióticos.	38

3.4.3.1. Intolerancia a la lactosa.	38
3.4.3.2. Prevención de diarrea a causa de ciertas bacterias patógenas y virus.	39
3.4.3.3. Cáncer.	39
3.4.3.4. Modulación de la función inmunitaria y prevención de alergias.	39
3.5. Clasificación de las leches fermentadas.	39
3.6. Principales tipos de leches fermentadas.	41
3.6.1. Yogurt.	41
3.6.2. Kumis.	41
3.6.3. Kéfir.	41
3.7. Diferencias entre el yogurt y el kéfir.	42
3.8. Bebida de kéfir.	43
3.8.1. Historia del origen del kéfir.	44
3.8.2. Tipos de kéfir.	44
3.8.3. Valor nutritivo.	45
3.9. Gránulos de kéfir.	45
3.9.1. Aumento de la biomasa de los gránulos.	47
3.9.2. Microorganismos en los gránulos de kéfir y en el kéfir.	47
3.9.2.1. Importancia de las levaduras.	48
3.9.2.2. Simbiosis en los gránulos de kéfir.	49
3.10. Kefiran.	51
3.11. Métodos de producción.	52
3.11.1. Método tradicional.	52

3.11.2. Producción industrial.	53
3.11.3. Producción de kéfir “estilo ruso”.	54
3.12. Parámetros físico-químicos.	55
3.13. Composición del kéfir.	55
3.13.1. Contenido de dióxido de carbono.	55
3.13.2. Contenido en grasa.	56
3.13.3. Contenido de lactosa/ácido láctico.	56
3.13.4. Contenido de etanol.	57
3.13.5. Aminoácidos.	57
3.13.6. Otros componentes.	58
3.14. Beneficios del kéfir para la salud.	58
3.14.1. Actividad antimicrobiana.	58
3.14.2. Sistema digestivo.	59
3.14.3. Sistema inmune.	60
3.14.4. Intolerancia a la lactosa.	60
3.15. El sabor de kéfir.	61
3.15.1. Análisis sensorial: Pruebas de aceptabilidad	61
3.15.1.1. Pruebas afectivas o hedónicas.	63
3.16. Preservación de los gránulos de kéfir.	64
3.16.1. Almacenamiento de los gránulos de kéfir.	65
3.16.2. Reactivación de los gránulos de kéfir.	65
Capítulo IV	
4.1. Tipo de estudio.	67
4.1.1. Prospectivo.	67

4.1.2. Retrospectivo.	67
4.1.3. Experimental.	67
4.2. Investigación bibliográfica.	68
4.3. Parte experimental.	68
4.3.1. Producción inicial de gránulos de kéfir a nivel de laboratorio.	68
4.3.2. Adaptación de los gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C.	69
4.3.3. Obtención de leche fermentada a partir de la leche descremada UHT con los gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C.	70
4.3.4. Identificación de las condiciones óptimas de fermentación.	71
4.3.5. Determinaciones realizadas en las 36 fermentaciones a las temperaturas de 20°C 25°C y 30°C.	72
4.3.5.1.Determinación de biomasa.	72
4.3.5.2.Medición de pH.	72
4.3.5.3.Acidez titulable.	73
4.3.5.4.Características sensoriales.	73
4.3.6. Determinaciones fisicoquímicas realizadas a las fermentaciones elaboradas por triplicado para cada una de las temperaturas de ensayo 20°C 25°C y 30°C.	74
4.3.6.1.Acidez titulable.	74
4.3.6.2.Humedad.	74
4.3.6.3.Sólidos totales.	75
4.3.6.4.Cenizas.	75
4.3.6.5.Grasa.	76
4.3.6.6.Determinación de nitrógeno y proteínas.	77

4.3.7. Análisis microbiológico.	79
4.3.7.1. Recuento de bacterias aerobias mesófilas.	80
4.3.7.2. Recuento de Coliformes totales.	81
4.3.7.3. Recuento de bacterias ácido lácticas.	82
4.3.7.4. Recuento de hongos y levaduras.	82
4.3.8. Análisis microbiológico al saborizante de fresa.	83
4.3.8.1. Determinación de <i>Salmonella spp.</i>	83
4.3.8.2. Determinación de <i>Staphylococcus aureus.</i>	86
4.3.9. Saborización de kéfir.	87
4.4. Prueba de aceptabilidad	88
Capítulo V	
5.0. Resultados y discusión de resultados.	91
Capítulo VI	
6.0. Conclusiones.	135
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones.	138
Bibliografía.	
Glosario.	
Anexos.	

## INDICE DE ANEXOS

### Anexo N°

1. Número de infecciones intestinales atendidas en El MINSAL en el período de Enero 2012-Diciembre 2013.
2. Esquema de procedimiento general.
3. Esquema de procedimientos de producción inicial, adaptación de los gránulos de kéfir y obtención de leche fermentada a partir de leche descremada UHT con los gránulos de kéfir.
4. Determinación del número de muestras.
5. Hojas de control por temperatura.
6. Tabla de Distribución de Fisher.
7. Cálculos Estadísticos.
8. Procedimientos de análisis fisicoquímicos realizados a la leche fermentada con gránulos de kéfir.
9. Procedimientos de análisis microbiológicos de leche descremada y leche fermentada con gránulos de kéfir: aerobios mesófilos, coliformes totales, bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras.
10. Procedimientos microbiológico para el saborizante de fresa: *Stapylococcus aureus*, y *Salmonella spp.*
11. Normativas.
12. Esquema de Saborización a leche fermentada.
13. Hoja Técnica Drogueria Hermel.
14. Certificado de Calidad de Drogueria Hermel.
15. Esquema prueba de aceptabilidad.
16. Hoja de evaluación hedónica.
17. Tabla T-Student.
18. Cálculos de prueba hedónica.

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro N°:</b>	<b>Pág.</b>
1. Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias utilizadas en leches fermentadas.	37
2. Clasificación de leches fermentadas de acuerdo al tipo de flora dominante.	40
3. Microbiota típica aislada de los gránulos de kéfir.	41
4. Clasificación de las pruebas sensoriales.	63

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°</b>	<b>Pág.</b>
1. Gránulos de kéfir.	46
2. Micrografía de gránulos de kéfir mostrando las bacterias que rodean una célula de levadura.	50
3. Estructura del kefirán.	51
4. Gránulos de kefirán congelados.	91
5. Medición de pH en las fermentaciones.	97
6. Tendencia de pH de fermentación a las diferentes temperaturas.	98
7. Proceso de valoración para la obtención del valor de acidez titulable.	99
8. Valores de acidez titulable durante doce fermentaciones a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C.	100
9. Tiempo de fermentación de las leches a las temperaturas establecidas.	102
10. Curva de distribución F con un $\alpha = 0.05$ .	104
11. Gráfico de aumento de biomasa.	108
12. Leche fermentada con gránulos de kéfir.	110
13. Recuento de bacterias en la leche descremada fermentada con gránulos de kéfir a) bacterias ácido lácticas b) hongos y levaduras c) coliformes totales.	121
14. Rango de edad de los participantes.	125
15. Percepción del sabor 305 (muestra sin saborizar).	128
16. Percepción del sabor 306 (muestra saborizada).	128
17. Percepción de la consistencia 305.	132
18. Percepción de la consistencia 306.	133

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°:</b>	<b>Pág.</b>
1. Resultados del aumento de biomasa en orden ascendente.	93
2. Media aritmética y mediana.	93
3. Valores dudosos que se alejan de la media y la mediana.	94
4. Resultados de promedios sin tomar en cuenta el dato dudoso.	94
5. Resultado de resta de cada dato menos el valor promedio correspondiente.	95
6. Resta del dato dudoso menos el valor promedio obtenido.	95
7. Valores de “d” multiplicados por 2.5.	96
8. Valores de pH final.	97
9. Valores de porcentaje de acidez titulable durante las doce fermentaciones.	99
10. Tiempo de fermentación de la leche.	101
11. Resumen de resultados estadísticos del aumento de biomasa.	103
12. Resumen de cálculos obtenidos para el cálculo de F.	107
13. Medias para biomasa por temperatura con intervalos de confianza del 95%.	108
14. Características sensoriales de la leche fermentada a 20°C 25°C y 30°C.	111
15. Resultados promedios del porcentaje de acidez titulable en términos de ácido láctico en la leche descremada fermentada a 20°C, 25°C y 30°C.	113
16. Resultado promedio de la determinación de humedad y sólidos totales en la leche descremada fermentada a 20°C, 25°C y 30°C.	114
17. Resultado promedio de la determinación de cenizas en la	

leche descremada fermentada a 20°C, 25°C y 30°C.	115
18. Resultado promedio de la determinación de cenizas en la leche descremada fermentada a 20°C, 25°C y 30°C.	116
19. Resultados de análisis de grasa por el método de Babcock.	117
20. Comparación de resultados obtenidos con la Norma del Codex para leches fermentadas.	118
21. Comparación de requisitos químicos con leche entera fermentada con gránulos de kéfir (Santos Rosa 2012) y leche descremada fermentada con gránulos de kéfir.	118
22. Resultados microbiológicos de muestras fermentadas a temperatura de 20°C.	119
23. Resultados microbiológicos de muestras fermentadas a temperaturas de 25°C.	120
24. Resultados microbiológicos de muestras fermentadas a temperaturas de 30°C.	120
25. Resultados microbiológicos de la leche descremada UHT.	123
26. Resultados microbiológicos del saborizante de fresa en polvo.	124
27. Edad de los participantes de la prueba hedónica.	124
28. Resultados de sabor de las muestras 305 y 306.	125
29. Resumen de resultados estadísticos para la obtención de t.	127
30. Resultados de consistencia de muestra 305 y 306.	130
31. Resumen de resultados estadísticos para la obtención de t.	131

## ABREVIATURAS

**ANOVA**= Análisis de varianza.

**BAL**=Bacterias ácido lácticas.

**BS**= Bismuto Sulfito.

**CENSALUD**=Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.

**CODEX**= Código.

**H<sub>a</sub>**=Hipótesis nula.

**H<sub>0</sub>**= Hipótesis alternativa.

**INCAP**= Instituto de nutrición Centroamérica y panamá.

**NC-TS**= Oficina Nacional de Normalización especificación técnica.

**RTCA**= Reglamento Técnico Centroamericano.

**Spp**= Especies.

**TSI**= Tripe Azúcar Hierro.

**UFC/g**= Unidades formadoras de colonia por gramo.

**UHT**=Temperatura ultra alta

## RESUMEN

El kéfir es una bebida a base de leche producida por la acción de bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias ácido acéticas, la cual al consumirla reduce el riesgo de contraer enfermedades intestinales puesto que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas. Debido al aumento de enfermedades crónicas como hipertensión, obesidad, diabetes entre otras, ha surgido la necesidad de ingerir alimentos que posean un bajo contenido de grasa, por todo lo anterior, el propósito de la investigación fue fermentar leche descremada UHT a partir de gránulos de kéfir. El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología y Microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, en el Laboratorio de Análisis Bromatológico y de Química Agrícola Aplicada, de la facultad de Química y Farmacia todos pertenecientes a la Universidad de El Salvador.

Para ello se determinó el aumento de la biomasa de los gránulos de kéfir durante doce fermentaciones consecutivas a temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C. Lográndose mayor producción a una temperatura de 20°C. A estas mismas fermentaciones se les midió el pH cuyos valores oscilaron entre 4.2 y 4.59; presentando porcentajes de acidez entre 0.6% hasta 0.9%. Además se evaluaron las características sensoriales a todos los productos y se logró determinar el tiempo de fermentación a las tres temperaturas.

No se logró obtener el producto idóneo de fermentación debido a la fluctuación de la biomasa, por lo que se elaboraron tres productos fermentados por cada temperatura, a los cuales se le realizaron análisis fisicoquímicos obteniendo los siguientes valores: acidez ( $0.74 \pm 0.05$ ) %, humedad ( $92.42 \pm 0.09$ ) %, sólidos totales ( $7.58 \pm 0.09$ ) %, cenizas ( $0.54 \pm 0.01$ ) %, proteína ( $4.43 \pm 0.03$ ) %, grasa 0%. Y en los análisis microbiológicos un recuento de bacterias ácido lácticas

mayor de  $6.5 \times 10^9$  UFC/g, contenido de levadura mayor de  $10^4$  UFC/g ausencia de Coliformes totales y hongos. Por lo que todos los resultados fueron conforme con la Norma internacional CODEX STAN 243-2003. Norma del CODEX para leches fermentadas y con la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007.

Posteriormente a una porción de leche fermentada se agregó sabor a fresa en polvo y se realizó una prueba hedónica, evaluando el producto con saborizante y en su forma natural; obteniendo una mayor aceptación el producto saborizado.

Los resultados anteriores, permite afirmar que el producto elaborado es apto para el consumo humano, debido a que cumple con las normativas internacionales y a su vez es aceptado por la población Salvadoreña. Por lo que se recomienda promover el consumo de la leche descremada UHT fermentada con gránulos de kéfir, por no poseer grasa, y por su numeroso contenido de bacterias ácido lácticas que convierte a esta bebida un alimento funcional.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

El consumo de leche fermentada ha sido asociado con efectos beneficiosos para la salud como en la prevención de enfermedades intestinales y fortalecimiento del sistema inmunológico. Existe una muy amplia variedad de leches fermentadas, en las que intervienen un gran número de especies de bacterias lácticas y algunas levaduras <sup>(9, 14, 21, 26, 27)</sup>.

Entre estas leches fermentadas se encuentra el kéfir que es una bebida a base de leche, producida por la acción de bacterias ácido lácticas (BAL), levaduras y bacterias ácido acéticas (BAA) en la leche, la cual es sometida tanto a fermentación láctica como alcohólica, lo que la convierte en un producto muy particular con propiedades únicas. El kéfir contiene bacterias como lactobacilos y levaduras que se han asociado con efectos probióticos, las cuales pueden mostrar un efecto sobre la colonización en el intestino, disminuyendo el número de infecciones intestinales; así como muchos otros efectos beneficiosos para la salud como la estimulación del sistema inmunológico, tratamiento y/o prevención de enfermedades <sup>(10, 33, 31,40)</sup>.

Por otra parte debido al incremento del número de personas que padecen enfermedades crónicas como la obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares se ha observado un aumento en el consumo de alimentos bajos en grasa como la leche descremada <sup>(2)</sup>.

Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende obtener un producto con efecto probiótico y que tenga un bajo contenido de grasa; por lo que tuvo como objetivo fermentar leche descremada UHT a partir de gránulos de kéfir. Para ello se realizaron doce fermentaciones consecutivas y a estas se les determinó biomasa, pH y acidez titulable. Con los resultados obtenidos se realizó la

prueba F para análisis de varianza conocido como ANOVA, con lo cual se determinó la temperatura de incubación que generó el mayor aumento de biomasa para los gránulos de kéfir durante la fermentación de la leche descremada UHT, con un pH entre 4.2 - 4.6 y una acidez titulable entre (0.6 - 1.0) % y características sensoriales (aspecto, olor, sabor y textura), propios de la leche fermentada con los gránulos de kéfir. Se realizaron análisis fisicoquímicos (humedad, cenizas, grasa, sólidos totales y proteínas) y microbiológicos, (BAL, coliformes totales, hongos y levaduras), los resultados se fueron comparados con la especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 y con la Norma internacional del CODEX STAN 243-2003 leches fermentadas obteniendo resultados satisfactorios por lo que el producto elaborado es apto para el consumo humano.

Con el fin de mejorar el sabor del producto se le agregó saborizante de fresa, el cual se realizaron análisis microbiológicos previamente como una inspección de la carga microbiana y de esta manera cuidar de la inocuidad de la leche fermentada con los gránulos de kéfir los resultados fueron comparados con Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08. Posteriormente para evaluar el nivel de aceptación o rechazo del producto sobre el sabor y la consistencia, se realizó una prueba hedónica de aceptabilidad, la cual se les brindó a los participantes dos muestras una con saborizante y otra sin saborizar.

El estudio fue realizado en el laboratorio de Biotecnología y Microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), en el Laboratorio de Análisis Bromatológico y de Química Agrícola Aplicada, de la facultad de Química y Farmacia todos pertenecientes a la Universidad de El Salvador. En el período comprendido de junio- septiembre de 2014.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## **2.0. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

**2.1.1.** Fermentar leche descremada UHT a partir de gránulos de kéfir.

### **2.2. Objetivos específicos**

**2.2.1.** Determinar la biomasa, el pH y la acidez titulable, a la leche descremada fermentada con los gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C durante doce fermentaciones consecutivas.

**2.2.2.** Establecer en base al tiempo de fermentación y el aumento de biomasa la temperatura adecuada para obtener un producto idóneo que cumpla con los requisitos característicos de la leche fermentada con gránulos de kéfir, a través de un análisis estadístico.

**2.2.3.** Evaluar las características sensoriales del producto (aspecto, color, sabor y apariencia) y comparar con la especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007.

**2.2.4.** Realizar el análisis fisicoquímico (humedad, cenizas, grasa, sólidos totales y proteínas) y microbiológico (bacterias acidolácticas, coliformes totales, hongos y levaduras) del producto y comparar con la Norma del CODEX para leches fermentadas CODEX STAN 243-2003 y la especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007.

**2.2.5.** Evaluar el nivel de aceptación del producto idóneo de fermentación, con saborizante artificial de fresa a través de una prueba de aceptabilidad.

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

### 3.0. MARCO TEORICO

#### 3.1. Alimentos funcionales (20, 32)

La relación entre la salud y alimentación ha adquirido gran importancia para la mayoría de la población. Por una parte, es cada vez más evidente la conexión entre la alimentación del individuo y ciertas enfermedades, sobre todo de carácter crónico, por ejemplo: obesidad, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras. También es importante destacar que los alimentos ya no son considerados por el consumidor solo como fuentes de nutrientes y energía, sino que además tienen un papel destacado en la conservación y promoción de la salud.

Los alimentos funcionales se definen como alimentos que además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedad, por ejemplo, puede actuar en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, el cáncer o la osteoporosis o mejorar algunas funciones fisiológicas, como sucede, por ejemplo, con el efecto probiótico. Los alimentos que contienen microorganismos probióticos constituyen una categoría dentro de los alimentos funcionales; estos suponen una oportunidad, tanto para la industria alimenticia como para el consumidor, para fomentar la salud a través de la nutrición, mejorando el estado de bienestar o reduciendo el riesgo de enfermar. Para ello es indispensable contar con un fundamento científico sólido que demuestre los efectos beneficiosos que se sugieren, sin olvidar en ningún momento que los alimentos funcionales tienen que ser siempre alimentos, y no comprimidos o pastillas, y que sus efectos han de alcanzarse en el marco de una dieta saludable. Dicho alimento debe, además ejercer su efecto beneficioso con las cantidades que normalmente son consumidas en la dieta.

Un alimento funcional no es siempre un producto nuevo. Algunos alimentos, como el ajo o las fresas, también pueden incluirse en este grupo.

### 3.2. Probióticos.

El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos.<sup>(43)</sup>

La palabra "probiótico" deriva etimológicamente del griego "por la vida". La OMS define los probióticos como "Microorganismos vivos que, suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo del huésped"<sup>(44)</sup>.

La FAO (Food and Agriculture Administration), en tanto, los define como “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas”<sup>(44)</sup>.

Los probióticos son microorganismos vivos que pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos, y suplementos dietéticos. Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las usadas más comúnmente como probióticos, pero la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *E. coli* y *Bacillus* también son utilizados como probióticos.

En términos estrictos, el término “probiótico” debe reservarse para los microorganismos vivos que han demostrado en estudios humanos controlados producir un beneficio a la salud<sup>(43)</sup>.

### 3.2.1. Historia del consumo de alimentos probióticos.

Desde tiempos antiguos el consumo de leches fermentadas que contienen cultivos bacterianos ha sido asociado con efectos beneficiosos para la salud, y los cultivos probióticos han tenido una larga asociación con los productos lácteos. Ya en el año 76 A.C el historiador Romano Plinio sugirió la administración de leche fermentada para tratar infecciones gastrointestinales <sup>(11)</sup>.

La observación original del rol positivo en la salud de estas bacterias se le puede acreditar al científico Ruso Metchnikoff el cual en 1907 sugirió que el consumo de alimentos como el yogurt, kéfir, y leche agria conteniendo bacterias ácido lácticas (BAL) estaba asociado con la buena salud y la longevidad. En su libro *la prolongación de la vida* reportó que los campesinos Búlgaros que consumían grandes cantidades de leche agria búlgara vivían más tiempo. La leche agria búlgara contiene el microorganismo *Lactobacillus bulgaricus* y Metchnikoff razonó que esta bacteria eliminaba bacterias putrefactas del sistema gastrointestinal <sup>(11, 35)</sup>.

Hoy en día los productos probióticos están disponibles en una variedad de formas, incluyendo los alimentos lácteos convencionales (como yogurt, leche, queso cottage), leches fermentadas, suplementos alimenticios y suplementos dietéticos (en capsulas o tabletas), y los productos continúan expandiéndose principalmente en Europa, Japón, y Estados Unidos <sup>(8)</sup>.

### 3.2.2. Bacterias Ácido Lácticas <sup>(11, 43)</sup>

Las bacterias de ácido láctico (BAL), entre las que se encuentra la especie *Lactobacillus* son una clase funcional de bacterias fermentadoras no patógenas, no toxigénicas, Gram positivas, caracterizadas por producir ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles para la fermentación de alimentos,

pueden ejercer una función doble, actuando como agentes fermentadores de alimentos y pudiendo además generar efectos beneficiosos a la salud.

Han sido utilizadas para la conservación de alimentos mediante fermentación durante miles de años. La fermentación se utiliza a nivel mundial para el mantenimiento de una gama de materiales agrícolas sin procesar (cereales, raíces, tubérculos, frutas y hortalizas, leche, carne, pescado etc.), brinda además perfiles de sabor característicos y reduce el pH, lo que impide la contaminación provocada por posibles patógenos.

### **3.2.3. Mecanismo de acción de los probióticos.**

- Digiere los alimentos y compite con los patógenos por los nutrientes
- Altera el pH local para crear un ambiente local desfavorable para patógenos
- Produce bacterioquinas para inhibir los patógenos
- Fagocita radicales superóxidos
- Estimula la producción epitelial de mucina
- Aumenta la función de barrera intestinal
- Compite por adherencia con los patógenos. Modifica las toxinas de origen patógeno

### **3.2.4. Efectos de los probióticos sobre la salud** (25, 32, 33)

#### **3.2.4.1. Evidencia científica**

Los profesionales de la salud están reconociendo cada vez más los efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud y la nutrición humana. Aumenta la evidencia que indica que el consumo de microorganismo probióticos puede ayudar a mantener un perfil microbiológico favorable con un resultado de muchos beneficios terapéuticos.

Estudios científicos recientes sobre las propiedades y la funcionalidad de microorganismos vivos en los alimentos sugieren que los probióticos desempeñan un importante papel en las funciones inmunitaria, digestiva y respiratoria, que podrían tener un efecto significativo en el alivio de las enfermedades infecciosas en los niños y otros grupos de alto riesgo. En una revisión sistemática donde se analizaron los efectos de los probióticos para el tratamiento de la diarrea aguda se concluyó al igual que en otros estudios, que la administración de probióticos en conjunto con la terapia de rehidratación, resulta en una reducción de la duración y severidad de la diarrea. Sin embargo, existiendo una marcada variabilidad clínica entre los diferentes resultados de los estudios y requiriendo más investigaciones para evaluar el efecto de manera cepa-específicas tanto en niños como en adultos; estos resultados permitirían a futuro desarrollar guías de tratamientos basados en la evidencia. Paralelamente, aumentó el número y tipo de los alimentos y bebidas probióticas disponibles a los consumidores.

#### **3.2.4.2. Prevención de infecciones intestinales** (32, 33).

La diarrea infecciosa es un importante problema mundial de salud, que causa varias muertes <sup>(43)</sup>, para El Salvador equivale aproximadamente al 65% (64,046 casos) de las 99,015 consultas por enfermedades infecciosas intestinales reportadas por el MINSAL para el año 2012, y el 67% (63,763 casos) de las 95,234 consultas reportadas por el MINSAL para el año 2013 (ver anexo N°1: número de infecciones intestinales atendidas en el MINSAL).

La producción de ácidos orgánicos por los probióticos puede disminuir el pH y alterar el potencial oxido-reducción en el intestino, resultando en una acción antimicrobiana; combinado con el limitado contenido de oxígeno en el intestino los ácidos orgánicos inhiben especialmente las bacterias patógenas Gram-negativas.

Los probióticos pueden prevenir las infecciones intestinales por la inhibición del crecimiento de patógenos y puede reducir el colesterol sérico en el intestino. Algunos de los mecanismos que al parecer explican la acción de los probióticos en los episodios diarreicos son la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y biosurfactantes) y la disminución del pH intestinal por el estímulo de organismos productores de ácido láctico, los cuales favorecen el crecimiento de organismos más beneficiosos. Otros probióticos aumentan la resistencia a la colonización al competir con los microorganismos patógenos por los sitios de unión en el endotelio intestinal y por los nutrientes que requieren para sobrevivir y desarrollarse.

#### **3.2.4.3. Fortalecimiento del sistema inmunológico.**

Los mecanismos de interacción de los probióticos con las células del sistema inmune son diversos. En el caso de las bacterias ácido lácticas, se ha observado que pueden ser captadas por las células M presentes en el epitelio y facilitar la estimulación del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal; Las células dendríticas pueden capturar bacterias probióticas al tener prolongaciones citoplasmáticas que pueden acceder al espacio luminal. Muchos de los efectos inducidos por los probióticos dependen de la interacción del microorganismo con la célula dendrítica, dada la capacidad que tiene de polarizar la respuesta inmunológica adaptativa. El efecto sobre la maduración de esta célula presentadora de antígeno y en su producción de citocinas depende de la cepa de probiótico, observándose casos de inhibición o estimulación de la producción de citocinas IL-10 e IL-12 lo cual, puede favorecer un estado de tolerancia o una respuesta inmune Th1, respectivamente.

Otros procesos inmunológicos que favorecen los probióticos son la producción de la inmunoglobulina A y M, la modulación de la producción de citocinas de la

respuesta adaptativa, la liberación de quemoquinas, la activación de las células asesinas naturales y el desarrollo de células T reguladoras.

La modulación del sistema inmune por parte de los probióticos puede tener beneficios para las personas en las diferentes etapas de la vida. En niños con antecedentes familiares de eczema atópico se ha documentado el beneficio de los probióticos en la prevención de esta enfermedad, incluso desde el periodo de gestación a través de la suplementación a la madre como posterior al nacimiento, suministrándolos por vía oral.

Existe evidencia del beneficio del tratamiento con bacterias ácido lácticas en niños, en pacientes desnutridos y adolescentes con diarrea. En cuanto a los jóvenes y adultos, se ha investigado la modulación del sistema inmune de bacterias ácido lácticas en personas sometidas a estrés, en prevención de infecciones del tracto urinario de mujeres en edad fértil y en el tratamiento de la alergia. Sin embargo, aún falta mayor investigación pues los estudios sobre estos efectos siguen siendo controvertidos y la evidencia existente no se considera concluyente. En el adulto mayor los estudios se han focalizado en observar la capacidad de los probióticos para contrarrestar la disminución del funcionamiento del sistema inmune que se presenta a esta edad.

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son dos formas de enfermedad inflamatoria intestinal, de las que se plantea que un desbalance entre las bacterias protectoras y patogénicas de la flora intestinal (disbiosis) puede estar relacionado a su patogénesis. El fundamento para utilizar probióticos en el tratamiento de estas enfermedades se basa en la posibilidad de colonizar el tracto intestinal con cepas bacterianas que promuevan una respuesta inmune de tipo protectora. En algunos estudios se ha encontrado que esta respuesta se basa en la producción de citocinas anti-inflamatorias, sin embargo, este no es el único mecanismo, varios estudios muestran que ciertas cepas probióticas

inducen la producción de IL-12 a concentraciones bajas y en otros casos de células T reguladoras.

### 3.3. Leche.

El código alimentario la define como el producto íntegro, no alterado, ni adulterado de la secreción de las glándulas mamarias de las hembras del ganado bovino obtenida por el ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas y libre de calostro, que no ha sufrido ningún tratamiento a excepción del filtrado y/o enfriamiento, y está exento de color, olor, sabor y consistencia anormales <sup>(39)</sup>. La denominación genérica de leche comprende única y exclusivamente la leche natural de vaca. Las leches producidas por otras hembras de animales domésticos se denominan indicando el nombre de la especie correspondiente: leche de oveja, leche de cabra, leche de burra, entre otras <sup>(40)</sup>.

**Leche pasteurizada:** 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 de la leche pasteurizada es de 72°C a 75°C durante 15 a 20 segundos o su equivalente <sup>(40)</sup>.

**Leche ultrapasteurizada:** la leche de vaca entera, semidescremada o descremada, que ha sido sometida a un proceso de calentamiento o 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 de la leche ultrapasteurizada debe ser de 135°C a 140°C por un tiempo mínimo de 2 a 4 segundos o su equivalente <sup>(32)</sup>.

**Leche homogenizada:** la leche pasteurizada o ultrapasteurizada que ha sido sometida a un tratamiento fisicomecánico apropiado para romper la columna de grasa tan finamente que no pueda volver a unirse y luego separarse en forma de crema o nata <sup>(40)</sup>.

### 3.3.1. Clasificación de las leches según su contenido de grasa.

#### **Leche entera.**

Es el producto íntegro no alterado ni adulterado del ordeño higiénico, regular y completo de vacas sanas y bien alimentadas, sin calostro y exento de color, olor, sabor y consistencia anormales y que no ha sido sometido a procesamiento o tratamiento alguno <sup>(8)</sup>. Contiene como mínimo el 3% de grasa. También se denomina completa <sup>(40)</sup>.

#### **Leche semidescremada o Semi-desnatada.**

La leche de vaca cuyo contenido de grasa es mayor de 0,15 % y menor 3,0 % m/m <sup>(40)</sup>.

#### **Leche descremada o desnatada.**

La leche de vaca cuyo contenido de grasa es menor o igual a 0,15 % m/m <sup>(40)</sup>.

### 3.4. Leche fermentada <sup>(16, 20, 39, 44, 50)</sup>

Bajo este nombre se engloban todos los productos que se obtienen utilizando como materia prima leche de diferentes especies (vaca, cabra, oveja, búfala y yegua), a la cual se le inocula un cultivo de microorganismos específicos que la fermentan. Como consecuencia de esta acidificación se modifican sus componentes y propiedades organolépticas, característicos de las leches fermentadas.

Según la definición del CODEX ALIMENTARIUS 243-2003. 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 la composición por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). 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.

Las leches fermentadas son preparados lácteos, en cuya elaboración, la leche, por acción de microorganismos específicos, es sometida a un proceso fermentativo que permite conferir características sensoriales específicas a los productos, a la vez que se prolonga el tiempo de conservación, debido a la disminución del pH. En este proceso, parte de la lactosa se transforma en ácido láctico por acción de los cultivos seleccionados. La formación de ácido láctico produce una acidificación y, en muchos casos, la coagulación del producto. Durante estas fermentaciones se acumulan metabolitos como el ácido láctico, el etanol y muchos otros que conservan la leche y le imparten características organolépticas distintivas.

#### **3.4.1. Historia del consumo de alimentos lácteos fermentados.**

El primer alimento fermentado pudo haber sido producido por accidente. Sin embargo, la fermentación de alimentos como la leche, se convirtió en un método muy utilizado para la preservación de los alimentos antes de la introducción de la refrigeración y de que los procedimientos de preservación como el enlatado y la pasteurización fueran desarrollados y utilizados para extender el tiempo de vida útil de los alimentos <sup>(11)</sup>.

Las leches fermentadas se consumen desde la antigüedad, específicamente en algunos países orientales (Asia, Europa Central). Su origen se ha establecido en el Oriente Medio. Su producción se inicia cuando el estilo de vida del ser humano pasa de ser recolector a productor de alimentos. La fermentación es uno de los medios más antiguos para la transformación de la leche en productos de mayor vida útil, debido a que al transformarse la lactosa en ácido láctico, se produce una disminución del pH, lo que inhibe el crecimiento de microorganismos <sup>(50)</sup>.

#### **3.4.2. Beneficios del consumo de leche fermentada.**

La transformación de la leche en estos alimentos fermentados representa varias ventajas, algunas de las cuales recientemente se han venido valorando a la luz de nuevos estudios. La más evidente de estas es la conservación, ya que estos productos tienen una vida de anaquel más larga que la leche natural; estos productos presentan además menor riesgo de contagio de toxiinfecciones que el producto fresco, debido a los distintos compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias que intervienen en la fermentación, las cuales inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos y productores de toxinas <sup>(12)</sup>. Entre los cambios que se producen en la leche está el descenso del pH (4,6-4), factor que contribuye al mantenimiento de un pH bajo en el estómago después de consumir la leche; la inhibición del desarrollo microbiano por los ácidos no disociados (eje., ácido láctico), y por otros metabolitos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otras sustancias con actividad antibiótica; un potencial de óxido-reducción bajo; y el consumo por parte de las bacterias lácticas de componentes que son vitales para otros microorganismos.

La correcta pasteurización de la leche cruda destruye cualquier patógeno que pudiera sobrevivir a la fermentación <sup>(50)</sup>.

**Cuadro Nº 1:** Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias utilizadas en las leches fermentadas <sup>(15)</sup>.

<b>Bacteria productora/compuesto</b>	<b>Microorganismos sensibles</b>
Bacterias lácticas en general <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácido láctico y otros ácidos</li> <li>- Peróxido de hidrogeno (activa el sistema lactoperoxidasa)</li> <li>- Diacetilo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacterias gramnegativas y fungi (bactericida)</li> <li>- Bacterias grampositivas (bacteriostático)</li> <li>- Bacterias y levaduras</li> </ul>
Bacterias lácticas en general <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácido láctico y otros ácidos</li> <li>- Peróxido de hidrogeno (activa el sistema lactoperoxidasa)</li> <li>- Diacetilo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacterias gramnegativas y fungí (bactericida)</li> <li>- Bacterias grampositivas (bacteriostático)</li> <li>- Bacterias y levaduras</li> </ul>
Compuestos específicos <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacteriocinas (biocidas de naturaleza peptídica)               <ul style="list-style-type: none"> <li><i>L. lactiss, lactis</i> : niacina</li> <li><i>L. lactiss, cremoris</i>: diplococcina</li> <li><i>L. delbrueckilss, bulgaricus</i>: <i>bulgaricano</i></li> <li><i>L. ácidophilus</i>: lactobacilina, lactocidina, ácidolina, ácidofillina</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacterias grampositivas</li> <li>- Bacterias grampositivas</li> <li>- Bacterias grampositivas y negativas</li> <li>- Bacterias grampositivas y negativas</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biocidas no peptídicos.               <ul style="list-style-type: none"> <li><i>p. freudenreichiss, shermani</i>: <i>microgard</i></li> <li><i>L. reuterli</i>: <i>reuterina</i></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacterias gramnegativas y algunos fungi</li> <li>- Bacterias y fungi</li> </ul>

### **3.4.3. Efectos sobre la salud del consumo de productos lácteos fermentados que contiene probióticos <sup>(20)</sup>.**

Los probióticos deben ser capaces no solo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino que también de proliferar en el intestino. Esto significa que deben ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en el intestino, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis y a las enzimas digestivas. Los efectos beneficiosos del consumo habitual de probióticos en la salud humana pueden resumirse en los siguientes aspectos.

#### **3.4.3.1. Intolerancia a la lactosa.**

Muchas personas que sufren de intolerancia a la lactosa evitan el consumo de lácteos, lo que condiciona un aumento en el riesgo de sufrir carencias de determinados nutrientes como el calcio. La lactosa ingerida en los alimentos y no digerida en el intestino delgado pasa directamente al colon, produciendo los síntomas que caracterizan este síndrome: dolor abdominal, diarrea, náuseas, flatulencia y/o distensión abdominal. Estos síntomas se pueden presentar en proporciones diferentes en cada persona ya que existe una variabilidad en la habilidad de la microbiota colónica para fermentar la lactosa; esta variabilidad explica los diferentes niveles de tolerancia en las personas. El uso de probióticos en personas con intolerancia a la lactosa reduce los síntomas de inflamación o hinchazón, posiblemente como consecuencia de la presencia de la lactasa microbial presente en las bacterias ácido lácticas, mejorando así la digestión de la lactosa.

#### **3.4.3.2. Prevención de diarrea a causa de ciertas bacterias patógenas y virus.**

Las pruebas más concluyentes se han obtenido utilizando *Lactobacillus rhamnosus GG* y *Bifidobacterium lactis BB-12* con fines de prevención y tratamiento de la diarrea aguda en niños causada principalmente por rotavirus y en adultos problemas ligados al tratamiento con antibióticos. La utilización de probióticos en estos casos se basa en la necesidad de administración de microorganismos comensales exógenos para restablecer la microbiota hasta un nivel más próximo al de la microbiota normal antes de la terapia con antibióticos.

#### **3.4.3.3. Cáncer.**

Existen datos iniciales que indican que los microorganismos probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer. La administración de lactobacilos y bifidobacterias podría teóricamente modificar la microbiota, dando lugar a una reducción de los niveles de  $\beta$ -glucoronidasa y sustancias carcinógenas.

#### **3.4.3.4. Modulación de la función inmunitaria y prevención de alergias.**

A través del incremento de la actividad fagocitaria, la producción de anticuerpos, así como una modulación en la producción de citoquinas

### **3.5. Clasificación de las leches fermentadas <sup>(16)</sup>\***

Existe una muy amplia variedad de leches fermentadas, probablemente algunos cientos en las que intervienen un gran número de especies de bacterias lácticas y algunas levaduras.

En algunos países el consumo de estos productos es superior al de la leche fresca y se utilizan leches de diferentes especies; por ejemplo vaca, borrego,

cabra, camella y yegua. Sus características pueden variar de un fabricante a otro, e incluso los microorganismos que intervienen en su elaboración pueden ser variables de acuerdo con la región, el procedimiento de inoculación y aun de las variaciones climáticas sin embargo la clasificación se hace posible cuando se agrupa a las leches fermentadas de acuerdo al tipo de la principal flora dominante.

**Cuadro N° 2:** Clasificación de leches fermentadas de acuerdo al tipo de flora dominante <sup>(16)</sup>

Grupo	Tipo de flora	Características	productos
I.	<i>Lactococcus</i> y en algunos <i>Leuconostoc</i> (bacterias mesofílicas)	Acidez baja o moderada	Jocoque, Buttermilk Leches escandinavas
II.	<i>Lactobacillus</i>	Acidez moderada o alta	Leche “búlgara” Leche acidófila Yakult
III.	<i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> (bacterias termofílicas)	Acidez moderada o alta	Yogurt, Dahi BALneh, Bioghurt Prostokvasha Branó, Gioddu
IV.	Bacterias lácticas y levaduras	Acidez y alcohol	<b>kéfir</b> Koumiss “Búlgaros”

Desde el punto de vista nutricional y de salud, las leches fermentadas aportan nutrimentos adicionales a los del producto fresco, como son: vitaminas del complejo B y una mayor cantidad de proteínas en productos concentrados como el yogurt y el labne. Además, las proteínas tienen mayor valor biológico debido a la pre hidrólisis que sufren por las proteasas producidas por las bacterias lácticas. También la grasa y la lactosa resultan más digeribles en estos productos que en la leche, por acción de las enzimas microbianas

### 3.6. Principales tipos de leches fermentadas

#### 3.6.1. Yogurt <sup>(39, 54)</sup>

Se entiende por yogurt o yoghurt al producto de leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche y/u otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche.

#### 3.6.2. Kumis <sup>(39, 54)</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 subsp. Bulgaricus* y *Kluyveromyces marxianus*.

#### 3.6.3. Kéfir

El CODEX ALIMENTARIUS define al kéfir como: cultivo preparado a partir de gránulos de kéfir, *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 cerevisiae* y *Saccharomyces sexiguus*) <sup>(39)</sup>.

**Cuadro N° 3.** Microbiota típica aislada de los gránulos de Kéfir. <sup>(54)</sup>

GENERO	ESPECIE
<b>Lactobacillus</b>	<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. kéfir</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kéfirgranum</i> ,
<b>Lactobacillus</b>	<i>Lb. kefiranofaciens</i> subsp. <i>Kefiranofaciens</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Lb. parakéfir</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. viridescens</i> .

**Cuadro N°3:** continuación.

<b>Streptococcus</b>	<i>S. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> .
<b>Lactococcus</b>	<i>Lc. lactissubsp.cremoris</i> , <i>Lc. lactisvar. diacetyllactis</i> , <i>Lc. lactissubsp.lactis</i> .
<b>Levaduras</b>	<i>Cándida kefir</i> , <i>C. pseudotropicalis</i> , <i>C. tenuis</i> , <i>C. rancens</i> , <i>C.friedricchii</i> , <i>Kluyveromyceslactisvarlactis</i> , <i>K. marxianusvar. marxianus</i> , <i>Issatchenkiaoccidentalis</i> , <i>K. bulgaricus</i> , <i>K. fragilis/marxianus</i> , <i>Pichiafermentans</i> , <i>Saccharomycescarlsbergensis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. exiguous</i> , <i>S. lactis</i> , <i>Saccharomycesubsp. torulopsisholmii</i> , <i>S. turicensissp. nov</i> , <i>S. unisporus</i> , <i>Torulasporadelbrueckii</i> , <i>Yarrowniaalipolytica</i> , <i>Zygosaccharomycesflorentinus</i> .
<b>Enterococcus</b>	<i>Enterococcusdurans</i> .
<b>Leuconostoc</b>	<i>Leuconostocmesenteroidessubsp.cremoris</i> , <i>L. mesenteroidessubsp. mesenteroides</i> .
<b>Acetobacterias</b>	<i>Acetobacteracetii</i> , <i>A. rasens</i> .

### 3.7. Diferencias entre el yogurt y el kéfir <sup>(50)</sup>.

La diferencia principal entre el proceso de fermentación de kéfir y del yogurt estriba en que el primero fermenta la leche mediante una reacción lacto-alcohólica (la lactosa se transforma en ácido láctico y se produce anhídrido carbónico y alcohol, este último en proporción menor al 1%) mientras que la del yogurt es solo láctica (solo se transforma la lactosa en ácido láctico). Además en el kéfir se encuentran pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub>, alcohol, y moléculas aromáticas, producto de la fermentación dual de las bacterias y las levaduras.

El yogurt se caracteriza por la presencia de dos tipos de bacterias bien diferenciadas: el *L. bulgaricus* y *S. termophilus*, presentes en una proporción similar, y unas cantidades ciertamente mínimas que fermentan la lactosa de la leche. Sin embargo, el kéfir no solo fermenta el azúcar de la leche en sí, sino que, a su vez, la caseína y la albumina. Otra de las diferencias más notables, es la consistencia de ambos productos, dado que el kéfir es líquido (caseína solubilizada), y el yogurt puede ser sólido o líquido.

### 3.8. Bebida de kéfir (1, 11, 16, 41, 50)

El kéfir es una bebida a base de leche, producida por la acción de bacterias ácido lácticas (BAL), levaduras y bacterias ácido acéticas.

La leche es sometida tanto a fermentación láctica como alcohólica, lo que la convierte en un producto muy particular con propiedades únicas. Una de sus características principales es la presencia de bióxido de carbono producido por las levaduras lo que la convierte en una bebida gaseosa y espumosa.

El kéfir tiene un ligero contenido de alcohol a diferencia de otros productos lácteos debido a que el kéfir no resulta de la actividad metabólica de una sola especie si no de la mezcla de la microbiota confinada en la matriz del “grano de kéfir”.

El producto es originario de Rusia, donde se consume en gran cantidad así como en otras repúblicas soviéticas y países de Europa del Este. El kéfir puede ser producido utilizando leche de vaca, oveja, cabras y búfalo, y es vendido en Europa bajo una variedad de nombres incluyendo kéfir, kiafur, kefir, kefer, knapon, kepi y kippe.

El inóculo utilizado en la valoración del kéfir es muy singular, se trata de una simbiosis de microorganismos atrapados en una matriz de polisacárido, los cuales forman masas del tamaño de gránulos de arroz o más grandes que reciben el nombre de “gránulos de kéfir”. Así el inóculo se encuentra literalmente inmovilizado en un soporte producido por el mismo y permite su reutilización retirándolo por filtración de la leche fermentada para volver a usarlo.

El kéfir puede ser consumido en su forma natural, o puede ser utilizado para cocinar (en sopas, salsas y tartas). La producción casera tradicional de kéfir se ha unido a la producción comercial en muchos países, y esta ha ayudado a

incrementar el consumo de kéfir y a promover su reputación de ser bueno para la salud.

### **3.8.1. Historia del origen del kéfir** <sup>(11, 16, 50)</sup>

El kéfir es una bebida refrescante que se originó en el norte de las montañas del Cáucaso. Su historia se remonta a la antigüedad, los campesinos preparaban el “ayrag” dejando remansar la leche de sus animales en odres fabricados a partir de pieles de cabras que nunca se lavaban o limpiaban y que colgaban cerca de la puerta de la casa en el exterior o el interior según la estación, y todos los que venían o salían debían empujar o golpear la bolsa con el fin de mezclar el líquido. Según se iba desarrollando la fermentación se iba añadiendo leche fresca para remplazar el “ayrag” que se iba consumiendo. En cierto momento se observó que la corteza esponjosa y blanquecina de la parte interior de la piel era capaz, si se le añadía leche, de dar una bebida similar (si no mejor) al ayrag original, el cual se denominó kéfir; lo que llevo a la producción del primer gránulo de kéfir y la fermentación natural tuvo lugar comenzando así una larga tradición de producción de kéfir.

Los gránulos de kéfir eran considerados como un regalo de Alá entre los musulmanes, donde se ha consumido corrientemente durante miles de años por lo que también se les conoce como “los granos del profeta Mahoma”.

De acuerdo con la leyenda Mahoma, era estricto en guardar el secreto de la preparación de kéfir a gente fuera de la fe, de lo contrario los gránulos perderían su fuerza mágica; Tal vez esta es la razón por la que el método de preparación de kéfir fue un secreto durante mucho tiempo.

### **3.8.2. Tipos de kéfir** <sup>(4)</sup>

Según la duración de la fermentación alcohólica se distinguen tres tipos

- Kéfir amarillo suave: líquido cremoso, de consistencia homogénea, muy espumoso, de sabor dulce y ligeramente alcoholizado.
- Kéfir medio: líquido cremoso, esponjoso con gusto a nata acida.
- Kéfir fuerte: muy esponjoso, muy aromático y de sabor agridulce.

### **3.8.3. Valor nutritivo.**

La composición del kéfir es variable y no está bien definida. Depende de la fuente, el contenido de grasa de la leche, la composición de los gránulos y del proceso tecnológico <sup>(50, 60)</sup>.

Al igual que todas las leches fermentadas, su contenido en lactosa disminuye como resultado de la fermentación. El kéfir contiene además vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales que ayudan al cuerpo en el mantenimiento de sus funciones vitales. Presenta un alto contenido en proteínas fácilmente digeribles, por estar parcialmente hidrolizadas, como sucede en otras leches fermentadas. Tiene un elevado contenido de triptófano y es rico en minerales como calcio, magnesio y fósforo y en vitaminas especialmente vitamina B<sub>12</sub>, tiamina, ácido fólico y vitamina K. También es buena fuente de biotina, que facilita la asimilación de otras vitaminas como el ácido fólico, el ácido pantoténico y vitamina B<sub>12</sub> <sup>(50)</sup>.

### **3.9. Gránulos de kéfir.**

El cultivo de kéfir está compuesto por gránulos de kéfir, los cuales juegan un papel importante en la producción del mismo debido a que son los responsables de la fermentación <sup>(42,50)</sup>.

Los gránulos de kéfir representan un ecosistema único formado por una relación simbiótica entre una microbiota compleja constituida por más de 50 especies de bacterias lácticas, ácido acéticas y levaduras, incrustados en una matriz compleja de proteínas y carbohidratos. La matriz está formada por un

polisacárido de glucosa y galactosa que recibe el nombre de kefirano el cual está constituido 24% por carbohidratos y 13% por proteínas <sup>(7, 41, 50)</sup>.

Análisis de los gránulos muestran que estos son una masa de bacterias, levaduras, polisacáridos y proteínas con una composición química de 890-900 g/kg de agua, 2g/kg de lípido, 30g/kg de proteína, 60 g/kg de azúcares, y 7 g/kg de ceniza <sup>(41)</sup>.

Los gránulos se describen como ramitos pequeños de forma similar a la coliflor, de color amarillo o blanco, y 20-30 mm de largo. De forma irregular, de consistencia elástica, con un diámetro muy variable (1 mm- 3cm) dependiendo de las condiciones de cultivo y uso. (Ver figura N°1)<sup>(11, 42)</sup>.



**Figura N° 1:** gránulos de kéfir <sup>(41)</sup>

En los gránulos de kéfir, el balance de la población de microorganismos determina la síntesis de metabolitos activos que son necesarios para el crecimiento del gránulo y la inhibición de microorganismos patógenos externos y alimentos contaminantes. Las bacterias, levaduras, polisacáridos y proteínas en los gránulos de kéfir se adicionan a la leche produciendo kéfir, generalmente

no hay etapa de pasteurización después de la fermentación, y por tanto las bacterias y levaduras se hallan en el producto terminado <sup>(11, 41)</sup>.

### **3.9.1. Aumento de la biomasa de los gránulos.**

La biomasa de los gránulos de kéfir aumenta lentamente después de fermentaciones sucesivas, los gránulos, aumentan alrededor de 5-7% de su biomasa.

Durante su crecimiento en la leche, las proporciones de microorganismos en los gránulos difieren de los presentes en el producto final. Estas diferencias están asociadas con las condiciones del proceso de fermentación, tales como tiempo de fermentación, temperatura, grado de agitación, tipo de leche, la relación del inóculo de gránulo/leche y distribución de los microorganismos, entre otros. Los microorganismos en los gránulos de kéfir fermentan la leche y los gránulos pueden recogerse al final del proceso de fermentación <sup>(11, 24, 41)</sup>.

### **3.9.2. Microorganismos en los gránulos de kéfir y en el kéfir <sup>(11, 41, 58)</sup>.**

En el kéfir las bacterias ácido lácticas (BAL) son las principales responsables de la conversión de la lactosa presente en la leche en ácido láctico, lo que resulta en una disminución del pH y conservación de la leche. Otros componentes microbianos de kéfir incluyen levaduras que fermentan la lactosa produciendo etanol y CO<sub>2</sub>. También participan en el proceso levaduras de fermentación no-lácticas y bacterias del ácido acético.

Con el fin de entender mejor el proceso de fermentación y a la vez evaluar los beneficios de la salud al consumir kéfir, el perfil microbiológico de este ha sido muy estudiado por investigadores para identificar las bacterias y levaduras en los gránulos de kéfir y en el producto final. Los primeros estudios revelaban que muchas de las bacterias aisladas estaban relativamente unidas, lo que era una dificultad para aislarlas e identificarlas. Los estudios y monitoreos de los

gránulos de kéfir son difíciles porque cuando varios microorganismos son separados de un cultivo puro estos no crecen en la leche o tienen una disminución de la actividad bioquímica; es por esto que el kéfir es citado como un ejemplo de simbiosis, el crecimiento y la supervivencia de las cepas individuales dependen de la presencia de los demás.

El aislamiento e identificación de microorganismos en los gránulos de kéfir y en el kéfir dependen de la elección de medios de crecimiento adecuado, y recientemente de los métodos de identificación sofisticados que se usan. En este punto debería notarse que la identidad de muchos organismos encontrados en kéfir ha sido revisada con el tiempo ya que se han utilizado métodos de clasificación más definitivos. En muchos casos la nomenclatura asignada a varias especies de bacterias también ha cambiado.

#### **3.9.2.1. Importancia de las levaduras** (11, 46).

En muchos productos de leche fermentada, las levaduras no son deseables, ya que ellas causan deterioro, debido al bajo pH que proporciona un medio ambiente selectivo para su crecimiento. Para el kéfir, las levaduras desempeñan un papel clave en el proceso de fermentación; aunque el número de levaduras en la bebida final es menor que en los gránulos; es importante mantener el equilibrio de las bacterias y levaduras, debido a que las levaduras contribuyen a las características únicas de kéfir.

El crecimiento de muchas bacterias aisladas de los gránulos de kéfir se mejora cuando se añade extracto de levadura al medio de crecimiento, lo que indica que las levaduras que se encuentran en los gránulos de kéfir son esenciales para mantener la integridad y la viabilidad de la población de microflora; debido a que proveen nutrientes esenciales para el crecimiento como aminoácidos y vitaminas, alteran el pH, secretan etanol y producen CO<sub>2</sub>.

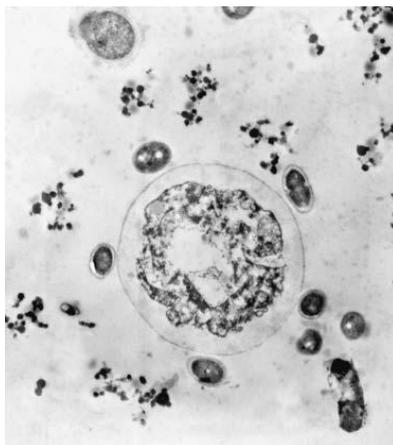
Las levaduras en los gránulos de kéfir han sido menos estudiadas que las bacterias, aunque es obvio que las levaduras en los gránulos de kéfir proveen el ambiente para el crecimiento de las bacterias, produciendo metabolitos que contribuyen al sabor del kéfir, las levaduras promueven también la simbiosis entre los microorganismos provenientes de BAL estimulando su crecimiento mientras que los productos finales metabólicos bacterianos son utilizados como fuente de energía por las levaduras.

Durante la fermentación alcohólica por las levaduras se forma  $\text{CO}_2$  y etanol, ambos compuestos son entre otros los responsables del sabor característico de los productos de kéfir. Las levaduras fermentadoras de la lactosa degradan la lactosa directamente, mientras que las levaduras no fermentadoras de la lactosa dependen de las bacterias ácido lácticas para hidrolizar la lactosa en galactosa y / o glucosa que posteriormente será metabolizados por la levadura en etanol. Además, el metabolismo en el cultivo de bacterias da lugar a la formación del sabor (La acidez proveniente del contenido de ácido láctico y el sabor característico de diacetilo, acetaldehído y acetato provienen del mismo metabolismo).

### **3.9.2.2. Simbiosis en los gránulos de kéfir** (11, 41, 58)

La población microbiológica parece ser diferente en la superficie de los gránulos que en el interior. Esto puede ser debido en parte a las diferencias en el pH a lo largo del gránulo; el interior tiene un pH muy bajo que inhibe el crecimiento de *Lactococos*. Generalmente, las bacterias largas en forma de bastón predominan en la superficie, mientras que las levaduras se concentran en el interior del gránulo. (Ver figura N° 2) Esta diferencia es importante porque los microorganismos de la superficie son los que probablemente tienen el mayor impacto en el proceso de fermentación que produce el kéfir. Se ha observado diferencias en el tipo de bacterias en las superficies de los gránulos propagable

y no propagable por lo que las bacterias en forma de bastón largo con apéndices filamentosos son necesarias para que los gránulos de kéfir funcionen. Sin embargo, una gran variación en la población bacteriana se produce entre los gránulos y aún dentro del mismo gránulo; por lo que el número de levaduras que se encuentran en el producto final son inferiores a las contadas en los propios gránulos, mientras que los *lactococos* son numerosos en la bebida final. Estudios recientes afirman que las bacterias en forma de bastón largo se localizan tanto en el interior como en el exterior del gránulo, mientras que las levaduras son más frecuentes en el exterior.



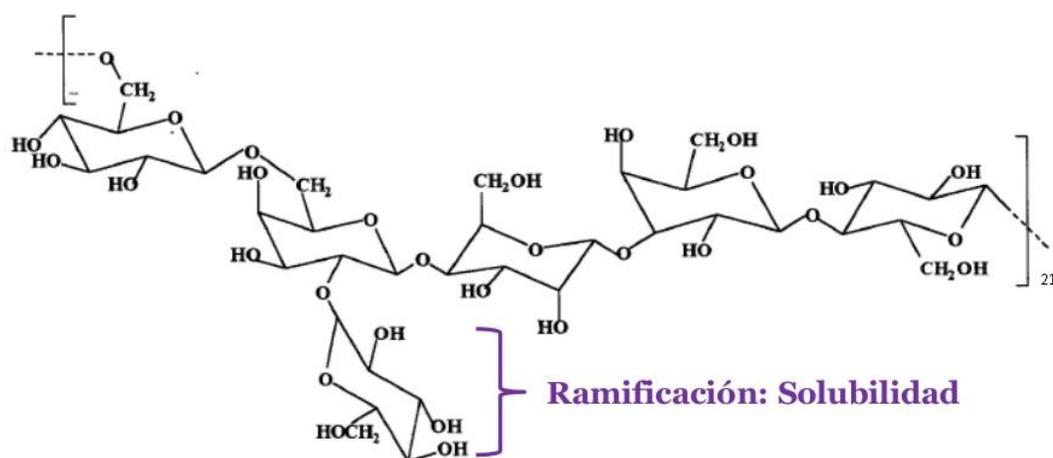
**Figura Nº 2:** Micrografía electrónica de gránulos de kéfir mostrando las bacterias que rodean una célula de levadura <sup>(11)</sup>.

La compleja composición microbiológica de los gránulos de kéfir produce el kéfir. La simbiosis encontrada en la población de microorganismos en el gránulo de kéfir permite que se mantenga la uniformidad de modo que durante todo el año el perfil microbiológico de los gránulos de kéfir y la bebida kéfir permanece estable a pesar de las variaciones en la calidad de la leche y la presencia de antibióticos y otras sustancias inhibidoras <sup>(11)</sup>.

No se esperaría que la lista de bacterias y levaduras que componen los gránulos sea muy extensa, ni debería variar significativamente de una región del mundo a otra si se tienen los mismos cuidados, las condiciones de crecimiento son similares, y las condiciones sanitarias adecuadas se mantienen; incluso se podría asumir que si una especie contaminante fuera a entrar en contacto con la población de kéfir, esta probablemente no sobreviviría o su crecimiento se vería inhibido debido a la producción de compuestos tales como bacteriocinas por la flora simbiótica de kéfir. Sin embargo, con el tiempo y bajo diferentes condiciones de crecimiento, los gránulos de kéfir pueden cambiar su composición y propiedades de fermentación microbianas <sup>(42)</sup>.

### 3.10. Kefiran

En las primeras observaciones de la estructura de los gránulos de kéfir se observó que algunas de las bacterias estaban encapsuladas por un polisacárido al que se le llamó kefiran el cual estaba conformado por proporciones aproximadamente iguales de glucosa y galactosa. (Ver figura N°3) <sup>(12,13)</sup>.



**Figura N° 3:** estructura del kefiran <sup>(12)</sup>.

Es un exopolisacárido ramificado hidrosoluble, producido por los gránulos o por microorganismos aislados de estos. Parece que los gránulos de kéfir son la

única fuente de kefiran, pero se desconoce si más de un polisacárido o diversos isómeros de kefiran existen en los gránulos de kéfir o en la bebida de kéfir. Algunos estudio Rusos afirman que los gránulos de kéfir pueden contener hasta 34% de polisacárido, mientras que la bebida final contiene 0,2 a 0,7% de polisacárido. Las bacterias que producen kefiran han sido objeto de una investigación adicional, no está claro cuántos distintos tipos de bacterias sintetizan el kefiran o polisacáridos similares al kefiran <sup>(12, 50)</sup>.

### **3.11. Métodos de producción.**

Tradicionalmente el kéfir es producido mediante la adición de gránulos de kéfir a una cantidad de leche <sup>(12)</sup>.

La adición del gránulo de kéfir a la leche constituye el momento inicial de la fermentación y comienza la cinética de crecimiento de los microorganismos en la leche y la producción de ácidos, CO<sub>2</sub>, viscosidad y consumo de lactosa; al agregar los gránulos a la leche, las levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y ácido acéticas, (BAA) pasan inmediatamente a la leche, indicando que parte de los microorganismos adheridos al gránulo de kéfir se desprende y pasan a la fase líquida donde, junto a los microorganismos adheridos al gránulo, comienza la fermentación <sup>(29)</sup>.

El pH, el sabor, la viscosidad, la composición química/microbiológica del producto final puede ser afectado por el tamaño del inóculo añadido a la leche, cualquier agitación durante la fermentación, y el tipo de agitación, la temperatura y la duración del enfriamiento, la maduración y las etapas siguientes de la fermentación <sup>(12)</sup>.

#### **3.11.1. Método tradicional <sup>(11, 12)</sup>**

La producción casera de kéfir se practica en muchos países, y los estudios científicos han utilizado muestras a menudo recogidas de los hogares.

Es realizado mediante la adición de gránulos de kéfir directamente a la leche pasteurizada y enfriada. En la producción casera, la temperatura y tiempo de fermentación no están rígidamente controlados. El producto final no se puede utilizar para inocular nueva leche para producir kéfir porque el balance original de los microorganismos en los gránulos se ha visto alterado, por lo que los gránulos de kéfir son esenciales para el proceso.

La producción artesanal tradicional de kéfir implica la inoculación de la leche con una cantidad de gránulos (2 a 10) % y permitiendo la fermentación para proceder durante aproximadamente 24 h, a un pH predeterminado o hasta que se obtiene un sabor / textura deseada. La fermentación se lleva a cabo de 20°C hasta 25°C. la etapa de maduración, es llevada a cabo en 8°C a 10°C durante 15 a 20 horas. Los gránulos a continuación, se tamizan y se puede utilizar para una nueva fermentación o conservarse (1 a 7 días) en leche fresca. Dejando a los gránulos en el producto final dando como resultado una excesiva producción de acidez y una disminución del sabor.

### **3.11.2. Producción industrial**<sup>(11)</sup>.

Las propiedades del kéfir (químicas, físicas y organolépticas) fueron inicialmente difíciles de duplicar en producción a gran escala. Se desarrollaron algunos procesos donde no se utilizaron los gránulos, pero la calidad del producto era muy diferente del de kéfir fermentado con gránulos. La producción a gran escala de kéfir se ha visto obstaculizada por problemas relacionados con la reproducción de los gránulos de kéfir y la producción de un producto consistente. Sin embargo, la producción de kéfir a escala industrial es común en muchos países europeos. Diversas variaciones existen en los protocolos utilizados en la producción comercial de kéfir. Inicialmente, se utilizó el método conjunto para producir kéfir; en este procedimiento, la leche inoculada es introducida en botellas, fermentándose a una temperatura controlada hasta

formar un coágulo fuerte, para después ser enfriada. Sin embargo, el kéfir producido fue de baja calidad en comparación con el producido en menor escala con métodos tradicionales.

Hoy en día, el kéfir es producido por un método de agitación en que la fermentación, la formación de coágulos, la agitación, la maduración y refrigeración todo ocurre en un recipiente. La composición (características químicas, organolépticas, microbiológicas) del producto final depende del tipo de leche utilizada, la fuente de los gránulos, la preparación del cultivo lácteo (a menudo producido por trozos grandes tamizados y usando el percolador), la duración de la fermentación, la inclusión de una etapa de enfriamiento, y la inclusión de una etapa de maduración. Una diferencia importante en el tratamiento incluye la opción de utilizar cualquiera de los gránulos de kéfir o un extracto de gránulo libre de kéfir como cultivo lácteo.

### **3.11.3. Producción de kéfir “estilo ruso” <sup>(11)</sup>.**

Un inóculo sin gránulo o un cultivo lácteo se prepara mediante la realización de una fermentación tradicional de kéfir, tamizando el producto acabado, y usando el percolador para inocular la leche. Alrededor del 1% al 3% del cultivo madre se añade para pasteurizar la leche. Cuando se utilizan cultivos iniciadores liofilizados, el cultivo madre se prepara mediante la adición de 1 g de kéfir liofilizado iniciador en gránulo a 3 litros de leche. Se ha sugerido que la etapa de fermentación debe ser seguido por un paso de enfriamiento lento (a una temperatura de 8°C a 10°C) y luego una maduración, paso que permite a los microorganismos crezcan y el sabor y el aroma se desarrollen. Se ha comprobado que a medida que la temperatura de la etapa de fermentación aumenta (de 19°C a 28°C), el pH del kéfir producido se reduce y la viscosidad aumenta. Hay pocos cambios en las cantidades de CO<sub>2</sub> y etanol producido.

### 3.12. Parámetros físico-químicos <sup>(4,50)</sup>

Un buen kéfir debe presentar los siguientes parámetros físico-químicos, los cuales dependen de la duración de la fermentación:

- 0.6% a 1% de ácido láctico (pH 4,2-4,5).
- 0.6% a 3% de alcohol.
- 50% en volumen de gas carbónico.

### Composición del kéfir <sup>(4)</sup>

La composición microbiológica y química de kéfir es muy variable debido a que los productos de la fermentación en el producto final están muy influenciadas por la fuente de gránulos de kéfir utilizadas durante la fabricación. Además, se pueden utilizar diferentes tipos de leche (varias especies, diferentes niveles de grasa) y diferentes métodos de producción (comercial, artesanales). Generalmente, el pH de kéfir es entre 4,2 y 4,6. Los ingredientes más comúnmente medidos como indicadores de calidad son el CO<sub>2</sub>, proteínas, lípidos (grasas), lactosa, etanol, y ácido láctico.

#### 3.12.1. Contenido de dióxido de carbono <sup>(11, 46)</sup>

El dióxido de carbono se forma principalmente durante la fermentación alcohólica de la leche, las levaduras y muchas bacterias ácido lácticas heterofermentativas, son las responsables de la producción de CO<sub>2</sub> en el kéfir.

El contenido de CO<sub>2</sub> aumenta durante la fermentación mientras el pH desciende. El gas producido conduce a la formación de coágulos en forma "escamas finas" y también imparte una sensación chispeante en la boca. Por sí mismo, el CO<sub>2</sub> tiene mal gusto, pero posee una influencia en el sabor y contribuye a la frescura percibida. Además, se produce un efecto hormigueo/espumoso, que es característico para el kéfir. La presencia de burbujas de gas en la bebida ha llevado a referir al kéfir como el champaña de las leches fermentadas.

La formación de CO<sub>2</sub> es deseable hasta cierto punto. La falta de CO<sub>2</sub> provoca lo que se llama sabor plano, pero un exceso de CO<sub>2</sub>, durante la etapa de fermentación y continuando en el producto acabado presenta un solo problema: el embalaje, que puede provocar abultamiento de los recipientes y fuga del contenido. En algunos países, el kéfir ha sido producido o vendido en botellas de vidrio, sin embargo los recipientes de polietileno con una cubierta de aluminio o plástico, son más flexibles y pueden albergar el gas producido después del envasado.

### **3.12.2. Contenido en grasa** <sup>(1)</sup>.

El contenido de grasa de kéfir se puede modificar en función del tipo de leche fermentada. En estudios sobre diversos productos lácteos fermentados, se encontraron sólo pequeñas diferencias en el contenido de grasa y la composición (mono-, di-, y triglicéridos, ácidos grasos libres y esteroides) de kéfir en comparación con la leche de partida. El hecho de que ácidos grasos libres se encuentran en todas las leches fermentadas analizadas (incluyendo kéfir) indica una interrupción de las moléculas de grasa en la leche durante la fermentación, esto podría resultar en un aumento de la digestibilidad de la grasa de productos de leche fermentada en comparación con otras fuentes de grasa.

### **3.12.3. Contenido de lactosa/ácido láctico** <sup>(46)</sup>.

La lactosa de la leche se degrada a ácido láctico durante la fermentación, lo que causa que el pH a caiga y que la leche espese. Como mucho el 30% de la lactosa de la leche es desglosada durante la fermentación.

2 β-galactosidasa es la enzima que hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa. La β-galactosidasa se encuentra en el yogur y en los gránulos de kéfir, pero la actividad β-galactosidasa es muy bajo en kéfir.

#### **3.12.4. Contenido de etanol** <sup>(11, 46)</sup>.

El etanol da el característico sabor alcohólico al producto kéfir. La producción de etanol en el kéfir es complejo; levaduras y bacterias hetero- fermentativas ambas producen etanol. La cantidad de etanol producido es dependiente del proceso de fermentación y el tipo de recipiente utilizado (bien tapado o no). El Kéfir producido en pequeñas industrias lácteas en la antigua Unión Soviética a principios del siglo XX contenía niveles de alcohol entre el 1% y 2%. Hoy en día los métodos de producción resultan con niveles de alcohol más bajos. La concentración final de alcohol se determina en su mayor parte por el número de levaduras presente en los gránulos añadidos a la leche y por la duración de la fermentación. La mayor cantidad de etanol es producido durante la fermentación alcohólica.

El etanol parece ser producido hasta el final del proceso de fermentación, y su formación puede continuar incluso cuando el pH ha disminuido hasta el punto en el que las bacterias ácido lácticas en los productos ya no son activas. La concentración de etanol se puede aumentar en el producto final mediante el aumento de la temperatura durante la fermentación.

#### **3.12.5. Aminoácidos** <sup>(46)</sup>.

El kéfir tiene el mismo patrón de aminoácidos que la leche. Las proteínas de kéfir se digieren fácilmente debido a la acción de coagulación ácida y la proteólisis de proteínas de la leche. Los aminoácidos libres que se encuentran en la leche se consumen durante las primeras horas de fermentación por bacterias selectivas; a medida que la fermentación disminuye y el kéfir entra en la fase de maduración, la actividad proteolítica de otros microorganismos, tales como bacterias ácido acéticas y levaduras produce más péptidos y aminoácidos libres.

### 3.12.6. Otros componentes <sup>(46)</sup>.

- Ácido acético: el ácido acético contribuye tanto al gusto y el sabor se produce durante la degradación de citrato y también en el catabolismo de la lactosa. Sin embargo, el exceso de acetato no es deseable, ya que podría causar un sabor fuerte.
- Diacetil: diacetil es reconocido como un compuesto que contribuye al sabor "mantecoso" específico de la mantequilla, crema agria y queso crema. En productos frescos fermentados por un cultivo mixto, diacetil está presente en baja concentración, no más de 1-3 mg /l. Generalmente, esta concentración da un buen sabor en los productos lácteos fermentados.
- Acetaldehído: da un sabor a " manzana verde o" afrutado". Con el fin de crear un sabor equilibrado en productos donde normalmente no se desea este sabor, las cepas pertenecientes a especies de *Leuconostoc* son comúnmente usados como un componente de los cultivos mesófilos mixtos. Su función es reducir el nivel de acetaldehído. Sin embargo, en productos de kéfir, el acetaldehído es un compuesto volátil importante que contribuye al sabor.

### 3.13. Beneficios del kéfir para la salud <sup>(12)</sup>.

El kéfir tiene una larga historia de beneficios para la salud en los países de Europa oriental, donde se asocia con el bienestar general.

#### 3.13.1. Actividad antimicrobiana <sup>(41)</sup>.

Se ha observado el comportamiento antagonista de lactobacilos aislados de gránulos de kéfir contra *Escherichia .coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typjimurium*, *Salmonella. enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Y. enterocolitica*, *Candida albicans*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus. faecalis* pero no contra *Pseudomona. aeruginosa*

Estos estudios indican que la actividad antimicrobiana de kéfir se asocia con la producción de ácidos orgánicos, péptidos (bacteriocinas), dióxido de carbono, peróxido de hidrogeno, etanol, y diacetilo. Estos compuestos pueden tener efectos beneficiosos no solo en la reducción de patógenos transmitidos por los alimentos y las bacterias de deterioro durante la producción y el almacenamiento de bebidas, sino que también en el tratamiento y prevención de la gastroenteritis e infecciones vaginales.

### **3.13.2. Sistema digestivo** (1, 50, 60)

El efecto causado por el consumo del kéfir en la composición de la microbiota intestinal puede ser debido a una combinación de factores, tales como la inhibición directa del patógeno mediante ácidos y producción de bacteriocinas, además de la exclusión competitiva de patógenos en la mucosa intestinal. El consumo de kéfir aumenta significativamente el recuento de BAL en la mucosa intestinal y las enterobacterias y poblaciones de clostridios se reduce.

Se muestra una clara mejora en la digestión y absorción de la lactosa en los productos fermentados, debido a la actividad de la  $\beta$ - galactosidasa microbiana. Los productos lácteos fermentados se deben considerar en la formulación de dietas para los sujetos intolerantes a la lactosa. El kéfir parece mejorar la digestión de la lactosa y la tolerancia a la misma en adultos con intolerancia también parece tener un efecto estimulador sobre el funcionamiento y el vaciado gástrico.

El kéfir contiene lactobacilos que se han asociado con evidentes efectos probióticos y algunas levaduras tales como *Sacharomices. cerevisiae*, *Kluyveromyces iodderae*, *Kluyveromyces. marxianus humilis* y *Candida* las cuales pueden mostrar un efecto sobre la colonización en el intestino, disminuyendo el número de infecciones intestinales.

### **3.13.3. Sistema inmune** <sup>(12)</sup>.

Se ha propuesto que la estimulación del sistema inmune puede ser un mecanismo por el cual las bacterias probióticas pueden ejercer muchos de sus efectos beneficiosos.

La formación de péptidos bioactivos durante la fermentación o el proceso de digestión han mostrado una variedad de actividades fisiológicas, incluyendo la estimulación del sistema inmune en modelos animales; luego de la alimentación de ratones con gránulos de kéfir, se observó un incremento en la respuesta inmune específica de la mucosa intestinal (IgA) contra la toxina del cólera.

La estimulación del sistema inmune puede también ocurrir debido a la acción de los exopolisacáridos encontrados en los gránulos de kéfir. Se observó que el kefiran era capaz de modificar el balance de las células inmunes en la mucosa intestinal, demostrando la habilidad inmunomoduladora del kéfir en la respuesta inmune de la mucosa intestinal de los ratones. La administración de kéfir también induce a una respuesta en la mucosa intestinal, sugiriendo que los componentes del kéfir pueden estimular células del sistema inmune innato.

Por otra parte, también se ha demostrado que el kéfir lácteo posee actividades antimutagénicas y antitumorales que los ubican dentro de los alimentos lácteos funcionales más prometedores.

### **3.13.4. Intolerancia a la lactosa** <sup>(12, 41)</sup>.

Una proporción de la población global es incapaz de digerir la lactosa (el azúcar en mayor proporción en la leche), debido a insuficiencia intestinal de  $\beta$ -galactosidasa activa. Es conocido el hecho que los productos de leches fermentadas tienen un tiempo de tránsito más lento que la leche, Lo que puede

mejorar aún más la digestión de la lactosa. Algunos gránulos de kéfir han mostrado que poseen actividad  $\beta$ -galactosidasa.

La habilidad de disminuir la concentración de lactosa y la presencia de  $\beta$ -galactosidasa hacen los productos de leches fermentadas adecuadas para el consumo de personas clasificadas como intolerantes a la lactosa. Esto demuestra que algunos gránulos de kéfir muestran actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa, que permanece activa cuando se consume y que el kéfir contiene menos lactosa que la leche.

### **3.14. El sabor de kéfir** (11, 41)-

El sabor de kéfir ha sido descrito como "levadura", y los términos "hormigueo" y "espumoso" se han utilizado para describir la sensación en la boca del kéfir causada por la liberación del CO<sub>2</sub> atrapado.

Desde tiempos antiguos las quejas de los consumidores de kéfir sobre el sabor del kéfir tradicional ocurren sólo cuando el sabor de la levadura es muy pronunciado o acentuado. Sin embargo, el sabor no ha obtenido altos puntajes en las evaluaciones sensorial por consumidores norte americanos de Kéfir, pueden producirse puntuaciones superiores en pruebas de aceptabilidad del consumidor mediante la adición de sabor ya sea como con el sabor propio o como fruta preservada. También pueden añadirse fermentos lácticos que contienen bacterias que producen sabores para mejorar la aceptabilidad del producto. Aunque, la adición de fruta o de otras fuentes de azúcares puede causar la fermentación no deseada por levaduras después del envasado.

#### **3.14.1. Análisis sensorial: Pruebas de aceptabilidad** (31, 38)-

La calidad de un alimento está determinada por diferentes aspectos: cantidad y calidad de los nutrientes que lo contienen y la calidad y seguridad sanitaria. Sin

embargo lo que determinará la aceptación o rechazo del mismo está relacionado con la percepción subjetiva del consumidor, es decir aspectos ligados a la preferencia del color, sabor, textura, consistencia, presentación, etc. del producto. Por esto es importante que al introducir un alimento al mercado o cambiar algún aspecto del mismo realizar pruebas sensoriales al grupo al cual va dirigido el alimento.

La función básica del análisis sensorial es obtener medidas de las características sensoriales que son percibidas por los humanos, como lo son apariencia, aroma, sabor y textura. En este campo de estudio, el alimento es el elemento a ser medido y el hombre es el instrumento medidor, por consiguiente, la información obtenida del análisis sensorial es única y diferente de otras fuentes de información en la que los productos químicos y/o instrumentos se utilizan para caracterizar los alimentos.

En la industria alimenticia, la evaluación de las características sensoriales de los productos es percibida por los consumidores y es un componente esencial en el desarrollo, mantenimiento, optimización, mejoramiento de la calidad y evaluación del potencial de una marca particular de productos alimenticios. Algunos aspectos que han sido estudiados por científicos que trabajan en análisis sensorial son: facilidad de uso, flexibilidad de la respuesta del consumidor, poder discriminativo, validez y puntualidad de la respuesta obtenida, defectos numéricos y contextuales y problemas en el análisis de los datos estadísticos.

Existen tres tipos de pruebas sensoriales, las cuales se aplican de acuerdo al objetivo o aspecto que se quiere evaluar en el alimento o preparación.

**Cuadro N° 4:** Clasificación de las pruebas sensoriales <sup>(31)</sup>.

<b>Clasificación</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Pregunta de interés</b>	<b>Tipo de prueba</b>	<b>Características de panelistas</b>
<b>Discriminatoria</b>	Determinar si dos productos son percibidos de manera diferente por el consumidor	¿Existen diferencias entre los productos?	Analítica	Reclutados por agudeza sensorial, orientados al método usado,
<b>Descriptiva</b>	Determinar la naturaleza de las diferencias sensoriales	¿En qué tipos de características específicas difieren los productos?	Analítica	Reclutados por agudeza sensorial y motivación, altamente entrenados
<b>Afectiva</b>	Determinar la aceptabilidad de consumo de un producto	¿Qué productos gustan más y cuáles son los preferidos?	Hedónica	Reclutados por uso del producto, no entrenados

**3.14.1.1. Pruebas afectivas o hedónicas** <sup>(31, 38)</sup>.**Características generales de la prueba.**

Las pruebas afectivas o hedónicas se refieren al grado de preferencia y aceptabilidad de un producto. Este tipo de pruebas permiten no sólo establecer si hay o no diferencias entre las muestras, sino el sentido o magnitud de la misma. Dentro de las pruebas afectivas o hedónicas se pueden encontrar: pruebas de preferencia (preferencia pareada y categorías de preferencia) y pruebas de aceptabilidad

**Ventajas y limitaciones del método** <sup>(31)</sup>.

Una de las principales ventajas es que provee de información esencial del producto. Asimismo permite identificar el grado de gusto o disgusto de un

producto y relaciona el perfil descriptivo y otras variables para poder optimizar o mejorar el producto.

Dentro de las limitaciones es que los resultados pueden no ser claros y pueden dar un pobre diagnóstico, debido a que se trata de la apreciación en relación a los gustos y preferencias de panelistas. Puede resultar difícil obtener un panel representativo de la población objetivo y finalmente los datos o categorías de preferencia pueden ser ambiguos.

### **Pruebas de aceptabilidad** <sup>(31, 38)</sup>.

Las pruebas de aceptabilidad son usadas para identificar las características de un producto traducidas en grados de aceptabilidad de diferentes cualidades del mismo, por ejemplo: la aceptabilidad del sabor, color, consistencia, grado de dulzor, etc.

Estas se pueden realizar incluso ante situaciones adversas en el ambiente, es decir se pueden realizar en el hogar, en ambientes no especialmente diseñados para la prueba.

Las pruebas de aceptabilidad se utilizan por ejemplo en el caso que se quiera introducir un producto al mercado e indagar las expectativas del consumidor.

### **3.15. Preservación de los gránulos de kéfir** <sup>(41)</sup>.

Los gránulos de kéfir pueden preservarse liofilizados, secos o húmedos. El lavado constante disminuye su viabilidad, Algunos autores recomiendan mantener el kéfir húmedo a temperaturas de 4°C o seco a temperatura ambiente de 36 a 48 horas. Los gránulos de kéfir secos retardan su actividad de 12-18 meses, mientras que los gránulos húmedos retardan su actividad por solo un tiempo de 8-10 días.

**3.15.1. Almacenamiento de los gránulos de kéfir** <sup>(19,20)</sup>-

Para la propagación de un cultivo de kéfir se requiere una deseable y adecuada proporción de los microorganismos que componen los gránulos de kéfir. Una disminución del contenido de levaduras altera la velocidad de producción de biomasa. Los gránulos de kéfir pueden preservarse liofilizados, secos, o húmedos. Algunos autores recomiendan mantener los gránulos húmedos a 4°C o secados a temperatura ambiente de 36-48 horas.

Los gránulos de kéfir secos retienen actividad de 12-18 meses, mientras que los gránulos húmedos mantienen actividad por solo 8-10 días. Se han encontrado dificultades en mantener una calidad satisfactoria en los gránulos para producir a bebida con la viscosidad apropiada y aceptable.

Los gránulos separados durante el proceso de elaboración, para ser utilizados en una próxima inoculación, deben ser almacenados en agua fría a 4°C (con una pérdida de actividad en 8 días) o bien, secados a temperatura ambiente durante 48 horas. Una vez secos y envueltos en aluminio pueden conservarse durante 12 meses a una temperatura de 16°C.

**3.15.2. Reactivación de los gránulos de kéfir** <sup>(50)</sup>-

Se maceran en agua hervida durante 6 horas y luego en leche pasteurizada durante 24 horas.

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

## **4.0. DISEÑO METODOLOGICO.**

### **4.1. Tipo de estudio.**

#### **4.1.1. Prospectivo:**

La información que aporta este estudio, puede servir de parámetro para la elaboración de una bebida probiótica a partir de la leche descremada fermentada con gránulos de kéfir en las condiciones climáticas de El Salvador.

#### **4.1.2. Retrospectivo:**

Debido a que se ha realizado una investigación en El salvador sobre la fermentación de leche entera con gránulos de kéfir, pero a su vez se desconocía si es viable la fermentación y estandarización en las condiciones climáticas salvadoreñas a partir de leche descremada, es que lo pretende dar respuesta esta investigación.

#### **4.1.3. Experimental:**

En el transcurso de esta investigación se controlaron variables como: pH, acidez titulable, temperaturas de incubación y tiempos de fermentación. Así como también, se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos a la leche descremada fermentada con gránulos de kéfir.

Estudio realizado en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), en el Laboratorio de Análisis Bromatológico y de Química Agrícola Aplicada ambos de la Facultad de Química y Farmacia, todos pertenecientes a la Universidad de El Salvador, en el período comprendido en los meses junio-septiembre de 2014.

## **4.2. Investigación bibliográfica:**

Consistió en la recopilación de información en las siguientes bibliotecas:

- Central de la Universidad de El Salvador.
- Dr. Benjamín Orozco Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de El Salvador.
- “P. Florentino Idoate S.J” de la Universidad Centroamericana José Simeón Cañas.
- Universidad Salvadoreña “Alberto Masferrer”.
- Internet.

## **4.3. Parte experimental:**

### **4.3.1. Producción inicial de gránulos de kéfir a nivel de laboratorio** <sup>(18,22)</sup>.

A partir de los gránulos de kéfir que estaban almacenados a una temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$  se realizó el siguiente procedimiento (Ver esquemas de procedimientos en anexo N° 3).

- Se descongelaron los gránulos de kéfir a temperatura ambiente.
- Se colocaron en un tamiz plástico, se lavaron con 25 mL de agua desmineralizada estéril, se escurrieron y se determinó la biomasa inicial.
- Utilizando una relación 1:10, se inocularon los gránulos de kéfir en leche descremada usando un vaso de precipitado de capacidad adecuada.
- Se midió el pH inicial de la preparación (gránulos de kéfir + leche descremada UHT), se tapó el vaso de precipitado con papel parafilm y se incubó a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas (debido a que fue el tiempo permitido para monitorear la leche fermentada en las instalaciones del laboratorio)
- Transcurridas las 8 horas de fermentación se tomó el pH final.
- Luego los gránulos de kéfir fueron separados de la leche fermentada con ayuda de un tamiz plástico, se lavaron con 25 mL de agua desmineralizada estéril, se escurrieron y se determinó la biomasa final.

- Los gránulos que se obtuvieron fueron inoculados nuevamente en un volumen adecuado de leche descremada UHT, guardando siempre la relación 1:10.
- Se midió el pH y se incubó la preparación a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 14 horas. (incubación por toda la noche sin monitoreo de pH).
- El proceso anterior se realizó las veces necesarias hasta obtener la cantidad suficiente de gránulos de kéfir para continuar con los procedimientos descritos a partir del numeral 4.3.2.

#### **4.3.2. Adaptación de los gránulos de kéfir a $20^\circ\text{C}$ , $25^\circ\text{C}$ y $30^\circ\text{C}$ <sup>(18,22)</sup>.**

La biomasa total de gránulos de kéfir obtenida en el numeral 4.3.1 fue dividida en porciones de igual peso (tres, en total) y para cada una de ellas se realizó el siguiente procedimiento (Ver esquemas de procedimientos en anexo N° 3):

- Se separaron los gránulos de kéfir del líquido (leche descremada UHT) en el que se encontraban, se lavaron con 25 mL de agua desmineralizada estéril, se escurrieron y se determinó la biomasa inicial.
- Se inocularon los gránulos de kéfir por separado en leche descremada, en una relación 1:10, en vasos de precipitados de capacidad adecuada.
- Se midió el pH a cada preparación (gránulos de kéfir + leche descremada), se taparon los vasos de precipitados con papel parafilm y se incubaron (una preparación a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , otra a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y otra a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ).
- La preparación de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , se incubaron por 8 horas, y la preparación a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , se incubó por 24 horas.
- Posteriormente, se tomó el pH final, 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.

- Los gránulos que se obtuvieron en las temperaturas de 25°C y 30°C, se colocaron vasos de precipitados de capacidad adecuada, sumergidos en un nuevo volumen de leche descremada UHT y se colocaron en las temperaturas de incubación correspondientes hasta el día siguiente (14 horas); en el caso de la temperatura de 20°C, se dejaron los gránulos sumergidos en el mismo volumen hasta finalizar las 24 horas.
- Se realizó el procedimiento descrito anteriormente dos veces consecutivas.

#### **4.3.3. Obtención de leche fermentada a partir de la leche descremada UHT con los gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C<sub>(18,22)</sub>.**

Se pesaron 10.0 g de gránulos de kéfir obtenidos a cada temperatura de ensayo del numeral 4.3.2, se realizaron doce fermentaciones consecutivas (El número de fermentaciones se determinó, por medio de muestreo aleatorio simple (Ver determinación del número de muestras en anexo N°4).

Procedimiento (Ver esquemas de procedimientos en anexo N° 3):

- Se inocularon 10.0 g de gránulos de kéfir en 100 mL de leche descremada UHT, (relación 1:10), en vasos de precipitados de capacidad adecuada.
- Se midió el pH inicial de la preparación (gránulos de kéfir más leche descremada), se taparon los vasos de precipitados con papel parafilm y se incubó cada preparación a las temperaturas de ensayo 20°C, 25 °C y 30 °C.
- Luego se midió el pH de cada preparación cada 3 horas y se finalizó el proceso de fermentación cuando se obtuvo un pH de 4.2 a 4.6.
- Posteriormente se separaron los gránulos de kéfir de la leche fermentada con ayuda de un tamiz, se escurrieron y se les determinó la biomasa final.
- Se determinó pH, acidez titulable, (aceptando un valor entre 0.60 a 1.0%<sub>(30)</sub>) y características sensoriales (aspecto, olor, sabor y textura). A cada una de las leches fermentadas obtenidas en las diferentes temperaturas de ensayo.

- Finalizada cada fermentación a 25°C y 30°C, se almacenaron los gránulos de kéfir en un vaso de precipitado de capacidad adecuada, sumergidos en un nuevo volumen de leche descremada UHT y se colocaron en las temperaturas de incubación correspondientes hasta iniciar una nueva fermentación.
- En el caso de las fermentaciones de 20°C, una vez finalizada la fermentación no se almacenaron los gránulos de kéfir, e inmediatamente se inició una nueva fermentación.

Nota: En los casos que se tuvo que interrumpir las fermentaciones por más de un día los gránulos de kéfir se almacenaron en un vaso de precipitado de capacidad adecuada, sumergidos en un nuevo volumen (el necesario para cubrir los gránulos) de leche descremada, debidamente identificados a la temperatura de fermentación correspondiente, y se refrigeraron a una temperatura de 4 °C.

#### **4.3.4. Identificación de las condiciones óptimas de fermentación.**

Con los resultados obtenidos, se realizó la prueba F para el análisis de varianza el cual se conoce también como ANOVA, utilizando los programas STAT GRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.18 e IBM SPSS Statistics; los cuales se utilizaron para confirmar los resultados del análisis y así determinar la temperatura de incubación que generó el mayor aumento de biomasa de los gránulos de kéfir durante la fermentación de la leche descremada, con un pH entre 4.2 a 4.6, y una acidez titulable entre 0.60 a 1.0% y características sensoriales (aspecto, olor, sabor y textura), propios de las leches fermentadas con gránulos de kéfir<sub>(30)</sub>.

#### **4.3.5. Determinaciones realizadas en las 36 fermentaciones a las temperaturas de 20°C 25°C y 30°C.**

##### **4.3.5.1. Determinación de biomasa** <sup>(22)</sup>.

Se realizó de acuerdo al método gravimétrico propuesto por Andreja Goršek y Marko Tramšek al inicio y al final de cada proceso de fermentación.

Procedimiento (Ver procedimientos de análisis fisicoquímicos en anexo N° 8):

- Se filtraron los gránulos de kéfir con un tamiz plástico.
- Se escurrieron los gránulos de kéfir con el tamiz plástico.
- Se colocaron en un porta muestra estéril.
- Se pesaron en una balanza semi-analítica.

##### **4.3.5.2. Medición de pH** <sup>(25)</sup>

Se midió el pH al inicio, cada 3 horas y se finalizó la fermentación hasta obtener un pH de 4.2 a 4.6 en las doce fermentaciones consecutivas.

Procedimiento (ver procedimientos de análisis fisicoquímicos en anexo N° 8):

Se calibró el pH-metro (con compensación automática de temperatura utilizando una sonda CAT) con buffer pH 4 y buffer pH 7 y se tomó una muestra de la leche en fermentación de la siguiente manera:

- Inicialmente, con un agitador estéril se homogenizó la leche en fermentación.
- Se separaron los gránulos de kéfir de la leche fermentada (con ayuda de un tamiz plástico).
- Al líquido se le tomó el pH sumergiendo el electrodo directamente en la leche en fermentación. Esto se realizó por triplicado, y se reportó el promedio de dichos valores.
- Se unieron nuevamente los gránulos de kéfir con el líquido en fermentación en el vaso de precipitados donde se estaba monitoreando la fermentación inicialmente.

- Se tapó el contenedor, nuevamente con papel parafilm. Y se colocó en la temperatura de incubación que correspondía la fermentación.

#### 4.3.5.3. Acidez titulable <sup>(25)</sup>.

Se determinó el porcentaje de acidez, a cada una de las leches obtenidas en el proceso de fermentación, por el Método titrimétrico de la AOAC 947.05.

Procedimiento (Ver procedimientos de análisis fisicoquímicos en anexo N° 8):

- En un Erlenmeyer de 50 mL, se pesaron 10.0 g de muestra (leche fermentada) y se diluyó al doble del volumen utilizando agua desmineralizada libre de CO<sub>2</sub>.
- Se agregaron 3 gotas de fenolftaleína agitando en cada adición. Luego con una solución de NaOH 0.1 N, se valoró la muestra hasta que el primer color rosa fuese persistente.
- Se reportó la acidez como porcentaje de ácido láctico por peso, aceptando valores entre 0.6-1.0 %
- Esta determinación se realizó de una sola vez, en las 36 fermentaciones.
- Se realizaron los cálculos utilizando la siguiente ecuación:

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

Donde:

N=Normalidad del hidróxido de sodio.

0.09 Miliequivalente del ácido láctico.

#### 4.3.5.4. Características sensoriales <sup>(30)</sup>.

Se determinaron las características sensoriales de aspecto, olor, sabor, y textura que establece la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 Leches fermentadas-especificaciones (Ver Normativas en anexo N°11), a las

leches fermentadas obtenidas a las tres temperaturas de ensayo (20°C, 25°C y 30°C) durante las 36 fermentaciones consecutivas.

#### **4.3.6. Determinaciones fisicoquímicas realizadas a las fermentaciones elaboradas por triplicado para cada una de las temperaturas de ensayo 20°C 25°C y 30°C.**

##### **4.3.6.1. Acidez titulable** <sup>(25)</sup>.

Se determinó el porcentaje de acidez, por el Método titrimétrico de la AOAC 947.05 como se describe en el numeral 4.3.5.

##### **4.3.6.2. Humedad** <sup>(25)</sup>.

Se determinó el porcentaje de humedad por el método gravimétrico de la AOAC 14,152 (7.007).

Procedimiento (Ver procedimientos de análisis fisicoquímicos en anexo N° 8):

- Se calentó la estufa a una temperatura de 135±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 dejó enfriar durante 30 minutos y se pesaron con sus tapas en una balanza analítica.
- Se pesaron 2.0 g de muestra por triplicado 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 una temperatura de 135±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.

#### 4.3.6.3. Sólidos totales <sup>(24)</sup>.

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

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

#### 4.3.6.4. Cenizas <sup>(24)</sup>.

Se determinó el porcentaje de cenizas por el Método gravimétrico de la AOAC 14, (153).

Procedimiento (Ver procedimientos de análisis fisicoquímicos en anexo N° 8):

- 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 triplicado a una temperatura de aproximadamente 20°C y se homogenizaron con agitación vigorosa.
- Rápidamente se pesaron aproximadamente 5.0g de muestra en su respectivo crisol en balanza analítica y luego se evaporaron hasta sequedad en baño de vapor.
- Posteriormente se calentó las muestras en el horno a 525°C hasta que la ceniza se encontrara libre de carbono.
- Empleando pinzas, se trasladaron los crisoles al desecador, se dejó enfriar 45 minutos y se pesaron.
- Posteriormente se determinó el porcentaje de cenizas con la siguiente ecuación.

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

Donde:

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.

#### **4.3.6.5. Grasa** <sup>(24)</sup>.

Se determinó el porcentaje de grasa por el Método volumétrico de Babcock de AOAC 932.1

Procedimiento (Ver procedimientos de análisis fisicoquímicos en anexo N° 8):

- Se homogenizó la muestra.
- Se pesaron 9.0 g directamente en un frasco Babcock, previamente limpio y seco llevando por triplicado la muestra.
- Se agregaron por las paredes 13.0 mL de Ácido Acético Glacial en pequeñas porciones con bureta y agitando cuidadosamente en cada incorporación.
- Se agregaron 9.0 mL de Ácido sulfúrico concentrado en pequeñas porciones con bureta y agitando en cada incorporación.
- Posteriormente se adicionó agua destilada a una temperatura de 60°C hasta el cuello del frasco Babcock.
- Se dejó en baño de agua a una temperatura de 60°C por 5 minutos.
- Luego se centrifugó por 2 minutos.
- Se adicionó nuevamente agua a temperatura de 60°C hasta que la grasa se aproximó a la penúltima porción graduada del cuello del frasco Babcock.
- Se centrifugó por 1 minuto a 250 rpm.
- Se colocó el frasco Babcock en baño de agua a 60°C por 3 minutos.

- Finalmente se sacó el frasco Babcock de baño de agua, se secó y se midió la columna de grasa, obteniéndose directamente el porcentaje de grasa contenido en la muestra.

#### **4.3.6.6. Determinación de nitrógeno y proteínas** <sup>(25)</sup>.

Se determinó por triplicado el porcentaje de proteína por el Método Microkjeldahl-Titulación Directa AOAC 14,156.

Este se realizó en 3 fases: fase de digestión, fase de destilación y fase de valoración de la muestra.

Procedimiento (Ver procedimientos de análisis fisicoquímicos en anexo N° 8):

##### a) Fase de digestión.

- Se pesaron 0.1g de muestra.
- Se agregó a un tubo de Tecator para micro Kjeldahl de 250 mL.
- Se adicionó al tubo, que contiene la muestra pesada 8 mL de ácido sulfúrico y 3 g de la mezcla de catalizador (Kelpack).
- Se agitó durante 5 minutos esta mezcla.
- Se colocaron los tubos al mismo tiempo en el aparato de digestión Kjeldahl, a su vez, se encendió el sistema de extracción de vapores y condensación de gases.
- Se movió constantemente por medio de rotación los tubos y esperar hasta la aparición de un color azul o verde.

##### b) Fase de destilación

- Se enfriaron los tubos a temperatura ambiente.
- Se agregó a cada uno de los tubos aproximadamente 80 mL de agua desmineralizada.
- Se enfriaron los tubos nuevamente.

- Se adicionó 5 mL de solución de Hidróxido de Sodio al 40 % por cada mL de ácido sulfúrico que se utilizó en la digestión.
- En un erlemeyer de 250 mL, se adicionó 25 mL la solución de ácido bórico y 3 gotas de indicador mixto y colocarlo en el aparato de destilación (solución color rojo).
- Se destiló de 50 a 75 mL recibiendo el destilado en el erlenmeyer de 250 mL .y este se dejó en el aparato por 5 minutos después de trabajo del mismo (hasta que finalizó su función). Se observó un viraje de color de rojo a verde.

c) Fase de valoración:

Se dejó enfriar y se tituló con solución de ácido sulfúrico 0.02N hasta el viraje de color de verde a rojo.

Cálculos:

- El porcentaje de nitrógeno total se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{(V_{\text{H}_2\text{SO}_4} \text{ 0.02N} - V_{\text{blanco}}) \text{N ácido} \times 1.4007}{P}$$

Donde:

$V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$  = mL de solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02 N usado para valorar la muestra.

$V_{\text{blanco}}$  = mL del blanco.

N = Normalidad de la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

P = Peso de la porción de muestra en g.

1.4007 = Miliequivalentes de nitrógeno.

Multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor 6.38 se obtuvo el porcentaje de proteínas presentes en la muestra <sup>(38)</sup>.

Los resultados de los análisis de proteína, grasa, y acidez titulable se compararon con los parámetros establecidos por la Norma internacional del CODEX (Ver Normativas en anexo N° 11).

#### **4.3.7. Análisis microbiológico.**

Antes que se efectuaran las 36 fermentaciones se realizaron análisis microbiológicos de recuento de bacterias aerobias mesófilas, a la leche descremada UHT, utilizada como materia prima. Los resultados fueron comparados con los parámetros que establece el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08, del subgrupo de alimentos 1.2.(Ver Normativas en anexo N°11).

Además se realizaron análisis adicionales como el recuento de Coliformes Totales, recuento de hongos y levaduras, los resultados se compraron con el CODEX para Leches Fermentadas CODEX STAN 243-2003, y aunque estos son parámetros microbiológicos que se exigen a las leches fermentadas como producto final, se le realizaron a la materia prima como una inspección de la carga microbiana con respecto a estos microorganismos con el fin de cuidar de la inocuidad de las leche a fermentar con los gránulos de kéfir.

Posteriormente se elaboraron por triplicado, muestras de leche fermentada con gránulos de kéfir obtenida a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C, el cual se realizaron los análisis microbiológicos de recuento de coliformes totales, recuento de bacterias ácido lácticas, recuento de hongos y levaduras. Seguidamente los resultados se compararon con los parámetros establecidos CODEX para Leches Fermentadas CODEX STAN 243-2003 (Ver Normativas en anexo N° 11).

#### **Preparación de la muestra** <sup>(13)</sup>.

Se realizó este proceso para la leche descremada UHT y para las muestras elaboradas por triplicado de leche fermentada con gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C.

Procedimiento (Ver procedimientos de análisis microbiológicos en anexo N°9):

- Se preparó la dilución  $10^{-1}$ , pesando 10 g de muestra de una forma aséptica en un frasco que contenía 90 mL agua peptonada bufferada.
- Se homogenizó por 30 segundos manualmente, agitando 25 veces el frasco.
- De la dilución anterior, luego de ser agitada, se tomaron 10.0 mL con pipeta estéril y se adicionó a un segundo frasco de dilución que contenía 90 mL agua peptonada bufferada, esta fue la dilución  $10^{-2}$ .
- Se agitó la dilución, posteriormente 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 agua peptonada bufferada.

Nota: En el caso de la preparación de la muestra para la determinación de bacterias ácido lácticas en la leche fermentada, se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-6}$ . Debido a que se esperaban recuentos de un orden mayor de  $10^6$ <sub>(39)</sub>.

#### **4.3.7.1. Recuento de bacterias aerobias mesófilas** <sub>(33)</sub>.

Se realizó este proceso exclusivamente para la leche descremada UHT.

Procedimiento (Ver procedimientos de análisis microbiológicos en anexo N°9):

- Se pipeteó 1 mL de la dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  por duplicado y se colocaron en placas de petri estériles previamente identificadas
- Se adicionaron a cada una de las placas 20 mL de agar platecount, cuando este tenía una temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$ , se mezclaron, y se dejó solidificar el agar.
- Se invirtieron las placas y se dejaron en incubación a temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, llevando control del medio.
- Se realizó la lectura de las placas, utilizando un cuenta colonia.

#### 4.3.7.2. Recuento de Coliformes totales

Se realizó este proceso para la leche descremada UHT y para la leche fermentada con gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C.

Procedimiento (ver Procedimiento de análisis microbiológico en anexo 9):

- Se pipeteó 1 mL de la dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , por duplicado y se colocaron en placas de petri estériles previamente identificadas.
- Se agregaron 20 mL de agar VRBA (agar bilis y rojo violeta) fundido y llevado a una temperatura de 45°C, se mezclaron y se dejó solidificar el agar.
- Se recubrieron las placas con 5 mL más de agar VRBA, y se dejaron solidificar, esto se realizó con la finalidad de evitar el crecimiento en la superficie la difusión de colonias.
- Se invirtieron las placas e incubaron a 35 °C durante 48 horas.

Al hacer la lectura se observó que no hubo crecimiento de colonias, pero si hubieran crecido colonias, se hubiera realizado la siguiente prueba confirmatoria para 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.

#### 4.3.7.3. Recuento de bacterias ácido lácticas <sup>(33)</sup>.

Se realizó este proceso únicamente para la leche fermentada con gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C.

Procedimiento (Ver procedimientos de análisis microbiológicos en anexo N°9):

- Se pipeteó 1 mL de la dilución  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , por duplicado y se colocaron en placas de petri estériles previamente rotuladas.
- Se vertieron a cada una de las placas 20 mL de agar Lactobacillus MRS llevado y fundido a una temperatura de 45°C, se mezclaron y se dejó solidificar el agar, finalmente se sellaron con cinta adhesiva.
- Posteriormente se invirtieron las placas y se dejaron en incubación 37°C durante 48 horas, en condiciones anaerobias.
- Se realizó la lectura de las placas, utilizando un cuenta colonia.

#### 4.3.7.4. Recuento de hongos y levaduras <sup>(13)</sup>.

Se realizó este proceso para la leche descremada UHT y para la leche fermentada con gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C.

Procedimiento (Ver procedimientos de análisis microbiológicos en anexo N°9):

- Se pipeteó 1 mL de la dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , por duplicado y se colocaron en placas de petri estériles previamente rotuladas.
- Se adicionaron a cada una de las placas 20 mL de agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico (pH 3.5), fundido y llevado a una temperatura de 45°C, se mezclaron, y se dejó solidificar el agar, finalmente se sellaron con cinta adhesiva.
- Posteriormente se invirtieron las placas y se dejaron en incubación a temperatura ambiente durante 5 a 7 días, llevando control del medio.
- Utilizando un cuenta colonias, se determinó la cantidad de colonias presentes en cada una de las placas de las distintas diluciones.

#### **4.3.8. Análisis microbiológico al saborizante de fresa** <sup>(13)</sup>.

Se realizó de acuerdo a los parámetros que exige el RTCA 67.04.50:08 del sub grupo de alimento 16.3 mezclas en seco instantáneas para refrescos y postres (Ver Normativas en anexo N°11).

##### **4.3.8.1. Determinación de *Salmonella spp*** <sup>(13)</sup>.

Procedimiento (Ver procedimientos microbiológicos para el saborizante de fresa en anexo N°10):

Preparación de la muestra.

- Se preparó la dilución  $10^{-1}$ , pesando 25 g de muestra de forma aséptica en una bolsa plástica.
- Se adicionó 225 mL de Caldo Lactosado.
- Se transfirió a Stomacher, en el cual se agitó por 2 minutos a 260rpm.
- Se colocó en un frasco de capacidad adecuada.
- Se incubó por 24 horas a 35 °C.

##### **Aislamiento *Salmonella spp.***

- A partir de la dilución  $10^{-1}$  de la preparación de la muestra, se pipeteó 1mL con pipeta estéril.
- Se agregó en un tubo que contenía 10.0 mL de Caldo de Tetrionato y 0.1 mL en otro tubo que contenía 10.0 mL de caldo RappaportVassiliadis, se incubaron dichos tubos a 42°C por 24 horas. Este fue el enriquecimiento para *Salmonella spp.*
- Se tomaron dos asadas de los tubos con caldo Tetrionato y caldo Rappaport, se sembraron sobre la superficie de placas que contenía agar Bismuto sulfito (BS) y agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), se incubaron a 35°C por 24 horas.

- Se observó que no hubo crecimiento de colonias en ninguna de las placas. Pero si se hubiera dado el caso contrario, es decir un crecimiento de colonias se hubiera realizado el siguiente procedimiento:
  - Seleccionar dos colonias aisladas en agar Bismuto Sulfito y en agar Xilosa Lisina Desoxicolato.
  - Sembrar en placas que contengan agar TSA, para aislar la bacteria.
  - Incubar a 35°C por 24 horas.
  - De las colonias que crecieran en agar TSA se hubiese realizado pruebas bioquímicas.

**Indol:**

En caldo triptófano con el organismo en estudio incubar a 35°C durante 8 a 24 horas. Al finalizar este período, añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs por la pared interior del tubo. La formación de un anillo rojo-violeta indica que la reacción es positiva.

**Rojo metilo:**

Inocular en caldo Rojo Metilo con un cultivo puro de no más de 24 horas del microorganismo en estudio. Incubar a 35°C durante 8 horas. Luego de finalizado el tiempo de incubación agregar unas gotas de reactivo de rojo de metilo. La aparición de un color rojo indica que la reacción es positiva.

**Voges Proskahuer:**

Inocular el caldo RMVP con un cultivo puro de no más de 24 horas de microorganismo en estudio. Incubar a 35 °C durante 24 horas. Luego de finalizado el tiempo de incubación transferir 1 mL de caldo RMVP a un tubo limpio y agregar 0,6 mL de alfa-naftol al 5% y 0,2 mL de KOH al 40%. Agitar el tubo cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo

reposar durante 10 a 15 minutos. La formación de un color rosado desarrollado dentro de este tiempo indica que la reacción es positiva.

### **Agar citrato**

Inocular el agar inclinado en una sola estría en el pico. Utilizar un cultivo de 24 horas en un medio sólido en un medio sólido y cuidando no arrastrar medio de cultivo, ya que se pueden producir falsos positivos por crecimiento a partir del medio de cultivo del inóculo. Incubar a 35°C durante 4 días. La coloración de medio de verde a azul, indica prueba positiva.

### **Prueba de motilidad.**

Inocular en picada las cepas de microorganismos en el medio de cultivo e incubar por 24 horas a 37°C. La difuminación de la bacteria hacia los lados y aparición de un precipitado negro por la producción de H<sub>2</sub>S, indica prueba positiva.

### **Prueba TSI (Triple Sugar Iron ó Triple azúcar Hierro).**

Incubar los tubos de TSI con punta. Para ello introducir la punta hasta 3 a 5 mm. Del fondo del tubo. Tras retirar el asa del fondo, estriar el pico con un movimiento hacia uno y otro lado. Incubar a 35°C durante 24 horas. Posteriormente se debe medir el pH de los cultivos. Y a continuación observar cambios en el medio:

- Fondo ácido (amarillo): glucosa fermentada, y bisel ácido (amarillo): Lactosa y /o sacarosa fermentada.
- Fondo ácido (amarillo): glucosa fermentada, y bisel alcalino (rojo): Lactosa y /o sacarosa no fermentada.
- Fondo alcalino (rojo) y bisel alcalino (rojo): Ninguno de los tres glucósidos es fermentado.

- La aparición de burbujas en el fondo indica que la fermentación se ha efectuado con producción de gas.
- Un ennegrecimiento del medio indica la producción de ácido sulfúrico.

#### 4.3.8.2. Determinación de *Staphylococcus aureus* <sup>(13)</sup>.

- Procedimiento (Ver procedimientos para el análisis microbiológico del saborizante de fresa en anexo N°10):

##### **Preparación de la muestra.**

- Se preparó la dilución  $10^{-1}$ , pesando 25 g de muestra de forma aséptica en una bolsa plástica.
- Se adicionó 225 mL de agua peptonada bufferada (diluyente).
- Se transfirió a Stomacher, en el cual se agitó por 2 minutos a 260rpm.
- Se colocó en un frasco de capacidad adecuada, esta fue la dilución  $10^{-1}$ .
- Se agitó el frasco para homogenizar, luego se pipeteó 10 mL la dilución  $10^{-1}$ , con pipeta estéril se agregó a un frasco de dilución que contenía 90 mL de agua peptonada bufferada estéril, y esta fue la dilución  $10^{-2}$ .
- De la dilución anterior, luego de ser agitada se pipeteó 10.0 mL con pipeta estéril y se agregó a un frasco de dilución que contenía 90.0 mL de agua peptonada bufferada y esta fue la dilución  $10^{-3}$ .
- **Aislamiento de *Staphylococcus aureus*.**
- A partir de la dilución  $10^{-1}$ , se transfirió asépticamente 1.0 mL de muestra y se distribuyó en tres placas con agar Bair-Parker: 0.4, 0.3 y 0.3 mL.
- Se distribuyó el inóculo sobre la superficie del agar, utilizando una varilla en "L" estéril, se mantuvieron las placas en posición horizontal hasta que el inóculo se absorbiera por el medio de cultivo (aproximadamente 10 minutos).

- Las placas invertidas se incubaron por un tiempo de 48 horas a una temperatura de 35°C.
- Se observó que no hubo crecimiento de colonias. en caso contrario si hubiese crecimiento de colonias se seleccionarían de cada placa más de una colonia sospechosa de *Staphylococcus aureus* y se hubiera realizado la prueba de producción de coagulasa.

Se consideró realizar otros análisis microbiológicos adicionales para tener una mayor confiabilidad del saborizante de fresa, como el recuento de Coliformes totales, recuento de hongos y levaduras, como se describe en el numeral 4.3.7. Los resultados se compararon con el CODEX para Leches Fermentadas CODEX STAN 243-2003, estos son parámetros microbiológicos que se exigen a las leches fermentadas con producto final. Se realizaron al saborizante de fresa, como una inspección de la carga microbiana con respecto a estos microorganismos y conservar la inocuidad de la leche fermentada con los gránulos de kéfir.

#### **4.3.9. Saborización de kéfir.**

Se realizaron ensayos previos a pequeña escala, utilizando el saborizante en los porcentajes establecidos según reporta la ficha técnica sabor a fresa en polvo (Ver hoja técnica en anexo N° 13).

Procedimiento (Ver esquema de Saborización en anexo N°12).

- Se fermentó 2000 mL de leche descremada UHT en el cual se utilizaron los gránulos adaptados a la temperatura de 20°C, ya que a esta temperatura se obtiene las mejores características sensoriales tales como aspecto, sabor y textura.
- Debido a que la cantidad a fermentar era demasiado grande se distribuyeron los gránulos de kéfir de una manera equitativa en cada recipiente.
- El pH final de la leche fermentada fue de 4.4.

- Se dividió la leche fermentada en dos porciones iguales, y se dejó 1000 mL sin saborizar y los otros 1000 mL, se trabajó dentro de una cabina de flujo laminar vertical se le aportó sabor de la siguiente manera:
- Se pesaron 5g de sabor a fresa y se adicionaron al contenedor donde estaba la leche fermentada.
- Se mezcló por 5 minutos utilizando un agitador estéril magnético a 250 rpm
- Se pesó 3.12 g de stevia en polvo y se incorporó a la leche fermentada.
- Se mezcló por 5 minutos a 250 rpm.
- Se tapó con papel parafilm y se colocó en refrigeración a una temperatura de 4°C por 1 hora.

#### **4.4. Prueba de aceptabilidad** <sup>(31)</sup>.

Esta prueba se realizó en la biblioteca Dr. Benjamín Orozco de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador puesto que cumplía con los requisitos tales como: ventilación, iluminación, paredes blancas, separadores o cubículos y ambiente libre de olores.

Procedimiento (Ver esquema prueba de aceptabilidad en anexo N° 15):

- Se dio a degustar dos tipos de kéfir uno saborizado y el otro sin saborizar.
- Las muestras se codificaron, numéricamente tomando números de forma aleatoria, siendo 306 el código para el kéfir saborizado y 305 el del kéfir sin saborizar.
- Se agregó el kéfir saborizado y sin saborizar en vasos de muestra pequeños de aproximadamente 20 mL.
- Se eligieron 22 participantes de una forma aleatoria entre las edades de 17 a 65 años.
- A los 22 panelistas se les dio a degustar la muestra 306 y solo a 21 panelistas se les proporcionaron la muestra 305.

- Se ubicaron a los panelistas en cubículos, separados uno del otro, seguidamente se brindaron a los panelistas indicaciones generales, se les aportó una hoja de evaluación para la prueba hedónica (ver hoja de evaluación hedónica en anexo N° 16) en la cual se les pedía su valoración sobre la consistencia y el sabor de la bebida, usando una escala de 5 puntos en el nivel de aceptabilidad desde me disgusta mucho hasta me gusta mucho.
- Se les proporcionó a cada participante una galleta de soda, agua y una escupidera para que se limpiaran el paladar antes de probar la segunda muestra para evitar la dificultad de la captación de sabor y textura de la muestra.
- Se realizó el análisis de los datos a través de medidas de tendencia central y t-student con el fin de obtener información del grado de aceptación del producto y definir si existe una diferencia entre las dos muestras.

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

## 5.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 5.1. Determinación de biomasa, pH y acidez titulable, a la leche descremada fermentada con los gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C.

#### 5.1.1. Biomasa

##### 5.1.1.1. Producción inicial de los gránulos de kéfir.

Los gránulos de kéfir se encontraban congelados en recipientes estériles, por lo que el primer paso fue realizar el descongelamiento de los mismos a temperatura ambiente y se determinó la biomasa inicial.



**Figura N°4:** gránulos de kéfir congelados.

Luego se inocularon los gránulos en leche descremada para lograr la activación, y se inició el proceso de multiplicación de los gránulos a una temperatura de 25°C como se describe en el numeral 4.3.1, hasta obtener una biomasa de 45 g cantidad suficiente para realizar el paso siguiente que consiste en el acondicionamiento de los gránulos.

#### **5.1.1.2. Adaptación de los gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C.**

Se colocaron los gránulos en leche descremada, manteniendo las temperaturas de ensayo de 25°C y 30°C en estufas programadas. En esta parte del experimento se tuvo la limitante de no contar con un equipo que mantuviera constante la temperatura de 20°C por lo cual los gránulos se acondicionaron en un baño frío.

Este proceso se repitió hasta que los gránulos se adaptaron a fermentar la leche y crecer a las temperaturas correspondientes tal y como se menciona en el numeral 4.3.2.

#### **5.1.1.3. Obtención de leche fermentada partir de leche descremada UHT con los gránulos de kéfir a 20°C, 25°C y 30°C.**

Se fermentaron los gránulos de kéfir según lo estipulado en el numeral 4.3.3 a las temperaturas correspondientes durante 12 fermentaciones consecutivas. En estas, se pudo observar que no hubo un crecimiento constante de los gránulos de kéfir aunque fuera fermentado en las mismas condiciones, por lo que se decidió realizar el procedimiento nuevamente teniendo condiciones más estrictas tratando de eliminar los posible errores sistemáticos, personales y metodológicos que pudieran afectar el crecimiento.

#### **5.1.1.4. Aumento de biomasa de los gránulos de kéfir durante las fermentaciones.**

De los resultados obtenidos durante las fermentaciones se determinó el aumento de biomasa; para ello se realizó el cálculo de la diferencia de la biomasa final menos la biomasa inicial y se ordenaron los datos en forma ascendente. A la vez se realizó el cálculo del aumento de porcentaje de biomasa, el cual se determinó mediante la aplicación de la siguiente fórmula.

$$\text{Porcentaje de aumento de biomasa} = \frac{\text{aumento de biomasa}}{\text{biomasa inicial}} * 100$$

(Ver cálculos estadísticos en anexo N°7).

**Tabla N°1:** Resultados de aumento de biomasa en orden ascendente

Temperatura de fermentación 20°C		Temperatura de fermentación 25°C		Temperatura de fermentación 30°C	
Gramos	porcentaje	Gramos	Porcentaje	Gramos	Porcentaje
0.80	6.03	0.30	3.00	0.40	2.53
0.90	6.66	0.50	4.35	0.70	5.92
0.70	7.50	0.50	4.90	0.70	6.93
1.30	10.08	0.60	5.00	0.80	6.93
1.40	11.19	0.70	5.47	1.00	7.33
1.50	11.63	0.70	5.56	1.10	8.19
1.50	11.67	0.70	6.03	1.20	9.09
1.50	11.85	0.80	6.58	1.30	10.12
1.60	14.85	1.00	7.92	1.50	12.87
1.60	15.84	1.20	10.00	1.60	12.90
1.90	16.67	1.50	10.13	1.60	13.16
2.00	18.81	1.60	12.19	2.30	19.67

A estos datos de aumento de biomasa, se les calculó la media aritmética y la mediana. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N°2.

**Tabla N°2:** Media aritmética y Mediana

Temperatura/ medida	Media	Mediana
Biomasa 20°C	11.89	11.64
Biomasa 25°C	6.76	5.79
Biomasa 30°C	9.63	8.64

Con cada uno de los datos de aumento de porcentaje de biomasa obtenidos en la tabla N°1 se comparó el valor de la media aritmética y la mediana y se observó que habían algunos valores cuya tendencia se alejaba demasiado, lo cual podía afectar en cálculos posteriores; por lo que se decidió utilizar un método que pudiera comprobar si estos datos tenían que desestimarse o tomar

en cuenta para lo que se utilizó la regla 2,5 d para desestimación de datos, la cual dice que para que un resultado sea rechazado, la relación entre la desviación del resultado dudoso y la desviación media debe ser mayor a 2,5<sup>(57, 28, 55)</sup>. El resultado dudoso se muestra en la tabla N°3.

**Tabla N°3:** Valores dudosos que se alejan de la media y de la mediana.

Porcentaje de biomasa a 20°C	Porcentaje de biomasa a 25°C	Porcentaje de biomasa a 30°C
18.81	12.19	19.67

#### 5.1.1.4.1. Aplicación de regla 2,5d<sup>(57,28)</sup>.

El método de aplicación de la regla de 2,5d consiste en despreciar el resultado dudoso y calcular el desvío medio de los miembros restantes del grupo con respecto al valor medio de los mismos.

El primer paso que se realizó fue sumar todos los resultados excepto el dudoso y dividirlo entre el número de datos.

Ejemplo de cálculo a la temperatura de fermentación de 20°C:

$$\bar{X} = \frac{6.03+6.66+7.50+10.08+11.19+11.63+11.67+11.85+14.85+15.84+16.67}{11}$$

$$\bar{X} = 11.27$$

De la misma manera se calcularon las otras dos medias sin tomar en cuenta el resultado dudoso. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla N°4:** Resultado de promedios sin tomar en cuenta el dato dudoso.

Temperatura de fermentación 20°C	Temperatura de fermentación 25°C	Temperatura de fermentación 30°C
11.27	6.27	8.72

Después de esto se le restó a cada uno de los datos el promedio mostrado en la tabla N°4 tomándose los resultados como valores absolutos tal y como se muestra en la tabla N°5.

**Tabla N°5:** Resultados de resta de cada dato menos el valor promedio correspondiente.

Temperatura de fermentación 20°C	Temperatura de fermentación 25°C	Temperatura de fermentación 30°C
$ 6.03-11.27 =5.23$	$ 3.00-6.27 =3.26$	$ 2.53-8.72 =6.19$
$ 6.66-11.27 =4.60$	$ 4.35-6.27 =1.91$	$ 5.92-8.72 =2.80$
$ 7.50-11.27 =3.77$	$ 4.90-6.27 =1.36$	$ 6.93-8.72 =1.79$
$ 10.08-11.27 =1.19$	$ 5.00-6.27 =1.26$	$ 6.93-8.72 =1.79$
$ 11.19-11.27 =0.07$	$ 5.47-6.27 =0.79$	$ 7.33-8.72 =1.39$
$ 11.63-11.27 =0.35$	$ 5.56-6.27 =0.71$	$ 8.19-8.72 =0.53$
$ 11.67-11.27 =0.39$	$ 6.03-6.27 =0.23$	$ 9.09-8.72 =0.36$
$ 11.85-11.27 =0.58$	$ 6.58-6.27 =0.31$	$ 10.12-8.72 =1.39$
$ 14.85-11.27 =3.58$	$ 7.92-6.27 =1.65$	$ 12.87-8.72 =4.14$
$ 15.84-11.27 =4.57$	$ 10.00-6.27 =3.73$	$ 12.90-8.72 =4.17$
$ 16.67-11.27 =5.39$	$ 10.13-6.27 =3.86$	$ 13.16-8.72 =4.43$
<b>Suma = 29.76</b>	<b>19.12</b>	<b>31.67</b>
<b>Promedio (d)=29.76/11=2.70</b>	<b>19.12/11=1.73</b>	<b>31.67/11=2.64</b>

$d$  = valor promedio obtenido

Habiéndose obtenido estos datos se procedió a trabajar con el dato dudoso restándole el promedio obtenido mostrado en la tabla N°4. Los resultados se observan en la tabla N° 6.

**Tabla N°6:** Resta de dato dudoso menos valor promedio obtenido.

Temperatura de fermentación 20°C	Temperatura de fermentación 25°C	Temperatura de fermentación 30°C
$18.81-11.27= 7.54$	$12.19-6.27=5.92$	$19.67-8.72=10.95$

Conociendo el valor de “*d*” que es el valor promedio mostrado en la tabla N°5 se multiplicó cada uno por 2.5 proporcionando los siguientes resultados:

**Tabla N°7:** Valores de “*d*” multiplicados por 2.5.

Temperatura de fermentación 20°C	Temperatura de fermentación 25°C	Temperatura de fermentación 30°C
$2.70 * 2.5 = 6.75$	$1.73 * 2.5 = 4.33$	$2.64 * 2.5 = 6.6$

El criterio dice que si el resultado dudoso difiere del nuevo valor medio en una cantidad mayor que 2.5 veces el desvío medio de los demás miembros del grupo, debe rechazarse <sup>(57)</sup>. Por lo que se compararon los valores obtenidos en la tabla N°6 con los de la tabla N°7 quedando los resultados de la siguiente manera:

$6.75 < 7.54$  por lo que el valor de 18.11 se rechaza.

$4.33 < 5.92$  por lo que el valor de 12.19 se rechaza.

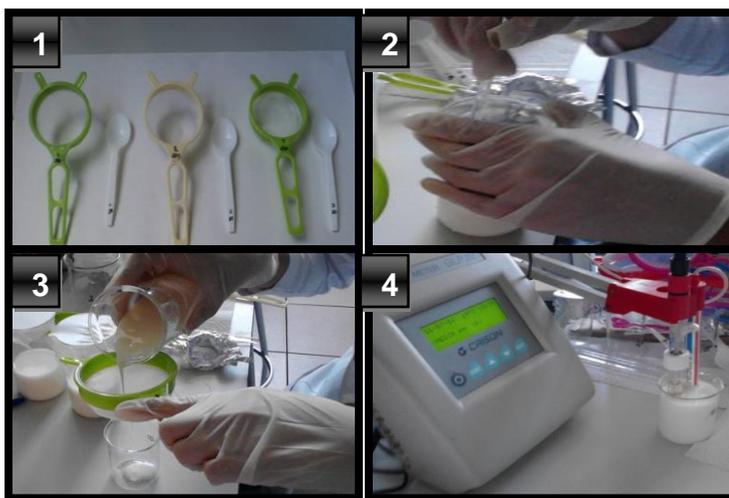
$6.60 < 10.95$  por lo que el valor de 19.67 se rechaza.

Los motivos por los cuales los datos tienen valores con una amplia variación entre sí puede deberse a varios factores entre ellos; el proceso y mecanismo de la formación del gránulo (del cual se conoce poco) <sup>(55)</sup>, la inestabilidad de la composición microbiológica de los gránulos de kéfir durante la producción de lotes sucesivos <sup>(47)</sup>, la posible influencia del tipo de leche utilizada, ya que se ha comprobado en estudios que los gránulos tienen un mayor aumento de la biomasa en leche descremada que en leche entera <sup>(55)</sup>, lo cual se puede observar en las fermentaciones realizadas en la tesis estandarización del proceso de fermentación de leche entera fermentada con gránulos de kéfir realizada por Santos y Vega (2012) <sup>(54)</sup>.

Habiéndose ya desestimado los datos desviados se procedió a calcular el incremento de biomasa por un método estadístico.

### 5.1.2. Medición de pH

La forma utilizada para la medición de pH (ver procedimientos de análisis fisicoquímico en anexo N°8) fue como se reporta en el numeral 4.3.5, ya que si se sumerge el electrodo directamente en la leche en fermentación, los valores obtenidos presentan variaciones considerables.



**Figura N° 5:** Medición de pH de las fermentaciones.

Los valores de pH obtenidos utilizando este procedimiento fueron consistentes ya que al hacer una nueva medición de la misma muestra daba el mismo valor; por lo que se comprobó que este nuevo método es el indicado para que no exista fluctuación de datos. Los valores de pH obtenidos se muestran en la tabla N°8.

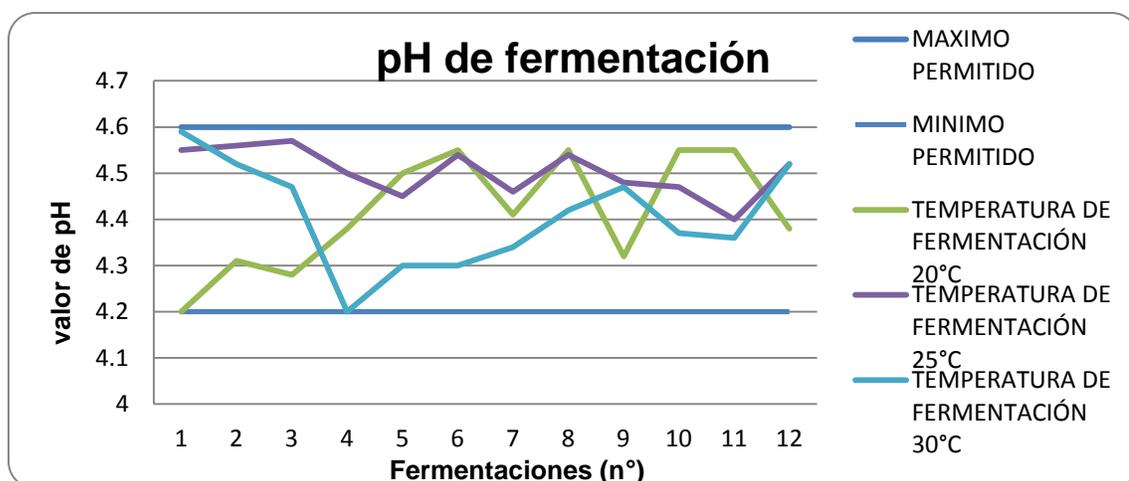
**Tabla N°8:** Valores de pH final.

Temperatura de fermentación 20°C	Temperatura de fermentación 25°C	Temperatura de fermentación 30°C
4.20	4.55	4.59
4.31	4.56	4.52
4.28	4.57	4.47
4.38	4.50	4.20

**Tabla 8:** continuación

4.50	4.45	4.30
4.55	4.54	4.30
4.41	4.46	4.34
4.55	4.54	4.42
4.32	4.48	4.47
4.55	4.47	4.37
4.55	4.40	4.36
4.38	4.52	4.52

La tabla N°8 muestra los datos de pH obtenidos durante las fermentaciones los rangos varían entre 4.20 y 4.59.

**Figura N°6:** Tendencia del pH de fermentación a las diferentes temperaturas.

Se puede observar que el pH se comporta de manera distinta dentro de las fermentaciones, aunque siempre está dentro del rango de pH permitido (4.20 a 4.60). Esto se debe a distintas razones como lo son la agitación de la leche; ya que si esta varía aunque sea un poco puede influir en la fermentación de la leche, debido a la liberación de etanol, lo cual causa un enlentecimiento de la fermentación <sup>(11,47,57)</sup> y por lo tanto en el pH; la temperatura de fermentación influyó en el comportamiento del pH ya que a mayor temperatura se produce una mayor cantidad de etanol debido a que la solubilidad del oxígeno en el

cultivo disminuye concomitantemente con el aumento de temperatura <sup>(23)</sup>, lo que conlleva a una disminución de pH más rápida debido a que se mejoran las condiciones que hacen posible la fermentación de la leche.

### 5.1.3. Determinación de acidez titulable

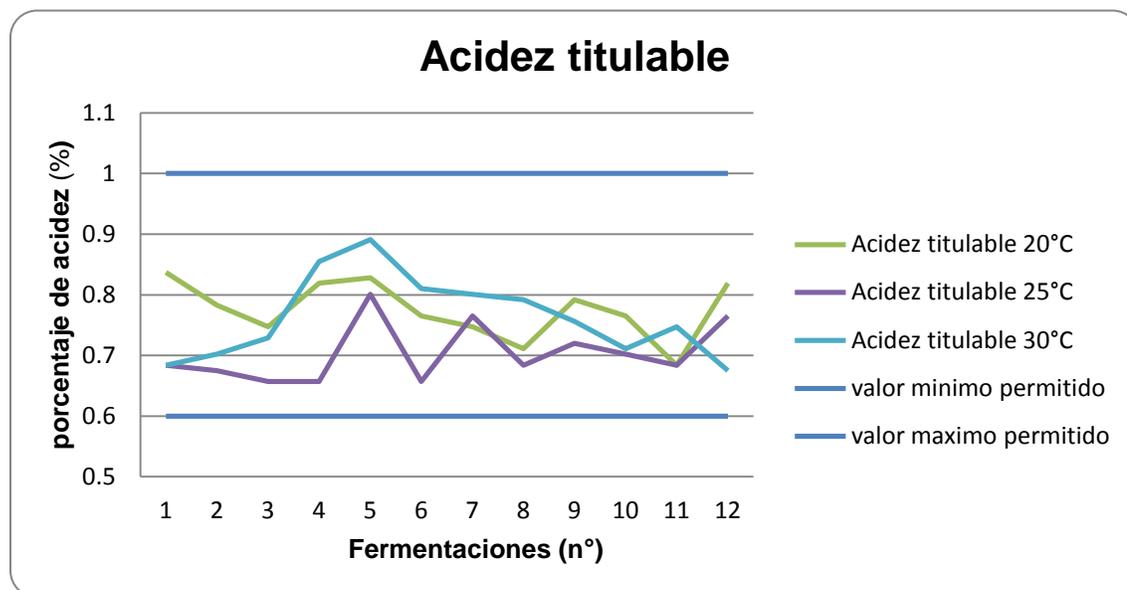
Se determinó la acidez titulable según lo descrito en el numeral 4.3.5 tomando en cuenta los valores límites de fermentación que varían de 0.6-1.0 % según la especificación Técnica Cubana. (Ver normativa en anexo N°11).



**Figura N°7:** Proceso de valoración para la obtención del valor de acidez titulable.

**Tabla N°9:** Valores de porcentajes de acidez titulable de las fermentaciones.

Acidez titulable 20°C	Acidez titulable 25°C	Acidez titulable 30°C
0.837	0.684	0.684
0.783	0.675	0.702
0.747	0.657	0.729
0.819	0.657	0.855
0.828	0.801	0.891
0.765	0.657	0.810
0.747	0.765	0.801
0.711	0.684	0.792
0.792	0.720	0.756
0.765	0.702	0.711
0.684	0.684	0.747
0.819	0.765	0.675



**Figura N°8:** Valores de acidez titulable durante doce fermentaciones a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C.

La acidez titulable es equivalente a la cantidad de ácido láctico en el producto <sup>(23)</sup>. Se puede observar tanto en la tabla de datos N°9 como en el gráfico de la figura N°8 que la temperatura de 30°C es la que muestra un valor superior de porcentaje de acidez, por lo tanto es la que contiene la mayor cantidad de ácido láctico; luego sigue la temperatura de fermentación de 20°C y de último la de 25°C. En teoría la temperatura de 20°C tuvo que ser la que presentara la acidez titulable más baja, <sup>(22, 23,55)</sup>, pero es posible que el tiempo de fermentación haya tenido influencia en este tipo de comportamiento ya que duraba un aproximado de 20 horas mientras que el tiempo de fermentación de las temperaturas de 25°C y 30°C duraba un aproximado de 8 y 5 horas respectivamente; por lo que en un lapso de tiempo de contacto de 20 horas de las bacterias ácido lácticas con la leche pudo producirse una mayor cantidad de ácido láctico provocando así que la acidez fuera mayor. Comportamiento similar se puede observar en los datos obtenidos de las fermentaciones de los gránulos de kéfir con leche entera, realizadas en la tesis estandarización del proceso de fermentación de

leche entera fermentada con gránulos de kéfir realizada por Santos y Vega (2012) <sup>(54)</sup>, donde las temperaturas de fermentación fueron de 25°C, 30°C y 35°C; y la temperatura que presentó el mayor porcentaje de acidez fue la de 25°C y esta fue la que tuvo un mayor tiempo de contacto con la leche.

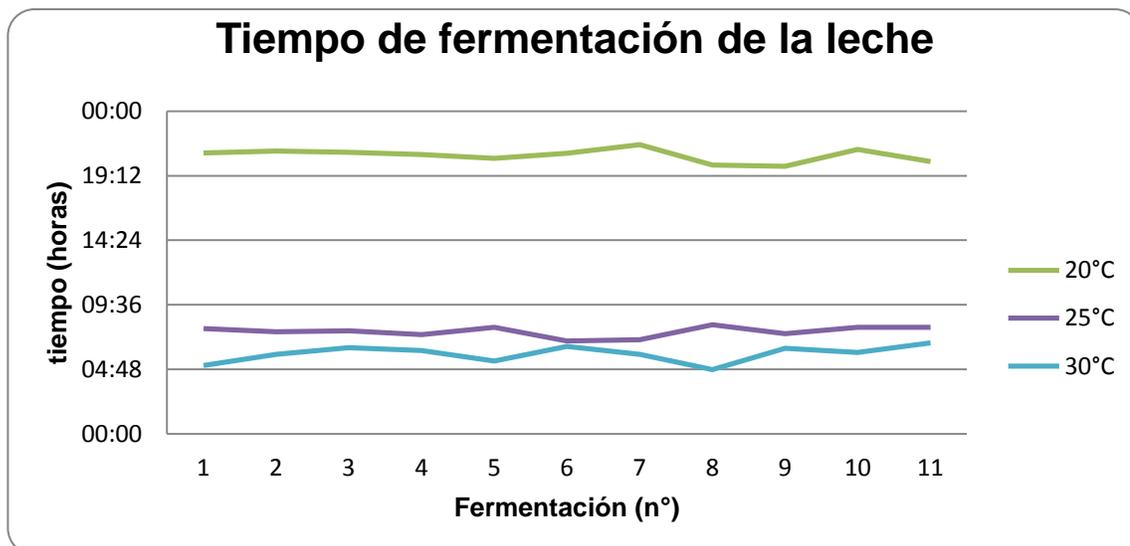
## 5.2. Determinación de tiempo de fermentación, aumento de biomasa y temperatura adecuada para obtener un producto idóneo.

### 5.2.1. Tiempo de fermentación.

En cada fermentación se midió el tiempo que tomaban los gránulos en fermentar la leche.

**Tabla N°10:** Tiempo de fermentación de la leche.

Tiempo de fermentación 20°C	Tiempo de fermentación 25°C	Tiempo de fermentación 30°C
20:53	7:50:00	5:05:00
21:02	7:36:00	5:55:00
20:56	7:39:00	6:25:00
20:47	7:23:00	6:11:00
20:30	7:55:00	5:24:00
20:52	6:54:00	6:30:00
21:30	7:00:00	5:55:00
20:00	8:06:00	4:46:00
19:54	7:27:00	6:22:00
21:10	7:55:00	6:03:00
20:15	7:55:00	6:45:00
<b>Promedio:</b> 20 horas 30 minutos	<b>Promedio:</b> 7 horas 30 minutos	<b>Promedio:</b> 6 horas



**Figura N°9:** Tiempo de fermentación de la leche a las temperaturas establecidas.

Tanto en la tabla N°10 como en la figura N°9 se puede observar que el tiempo que tardan los gránulos en fermentar la leche varía de acuerdo a la temperatura en la cual eran colocados teniendo una relación inversamente proporcional es decir a mayor temperatura menor tiempo de fermentación, esto debido a que a temperaturas elevadas se produce una cantidad superior de etanol debido a que el oxígeno se disuelve con mayor facilidad <sup>(23)</sup>. Este comportamiento es independiente del tipo de leche utilizada ya que se observa la misma tendencia con leche entera. (Santos y Vega 2012) <sup>(54)</sup>.

A nivel industrial es importante obtener una mayor cantidad de producto en el menor tiempo posible, pero a la vez que sea de buena calidad y tenga una buena aceptación; en base a lo primero sería adecuado el tiempo de fermentación menor, es decir 6 horas a 30°C, pero tomando en cuenta también lo segundo se concluye que sería el tiempo de 7 horas y 30 minutos es decir a una temperatura de 25°C ya que a esta temperatura se obtuvo una desviación menor en cuanto al crecimiento, (ver tabla N°11).

### 5.2.2. Cálculo del incremento de biomasa por medio de F.

**Tabla N° 11:** Resumen de resultados estadísticos de aumento de biomasa

Temperatura	Número de observaciones	Suma	Media aritmética	Desviación estándar	varianza
20°C	11	123.97	11.27	3.57	12.77
25°C	11	68.93	6.27	2.25	5.07
30°C	11	95.99	8.72	3.33	11.12
<b>Total</b>	33	288.89	26.26	9.16	28.36

A fin de realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba F para el análisis de varianza el cual consiste en contrastar la hipótesis nula con la hipótesis alternativa, esta prueba es usualmente conocida como ANOVA <sup>(35)</sup>. Para la interpretación de ANOVA se utilizaron dos programas estadísticos los cuales fueron STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.18y el IBM SPSS Statistics para tener un análisis más completo aunque pudo haberse utilizado solamente uno de los dos.

#### 5.2.2.1. Planteamiento de hipótesis:

- Hipótesis nula: no existe diferencias entre el aumento medio de biomasa a las tres temperaturas evaluadas.

$$H_0: \mu_{20^\circ\text{C}} = \mu_{25^\circ\text{C}} = \mu_{30^\circ\text{C}}.$$

- Hipótesis alternativa: existe diferencia entre el aumento medio de biomasa a las tres temperaturas evaluadas.

$$H_a = \mu_{20^\circ\text{C}} \neq \mu_{25^\circ\text{C}} \neq \mu_{30^\circ\text{C}}.$$

- Existe diferencia entre el aumento medio de biomasa a 20°C, pero no a 25°C ni 30°C.

$$H_a = \mu_{20^\circ\text{C}} \neq \mu_{25^\circ\text{C}} = \mu_{30^\circ\text{C}}$$

- Existe diferencia entre el aumento medio de biomasa a 30°C, pero no a 20°C y 25°C.

$$H_a = \mu_{20^\circ\text{C}} = \mu_{25^\circ\text{C}} \neq \mu_{30^\circ\text{C}}$$

- Existe diferencia entre el aumento de biomasa a 25°C, pero no a 20°C ni 30°C.
- $H_a = \mu_{20^\circ\text{C}} = \mu_{30^\circ\text{C}} \neq \mu_{25^\circ\text{C}}$

### 5.2.2.2. Cálculo de F de tabla

- Se tomó un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

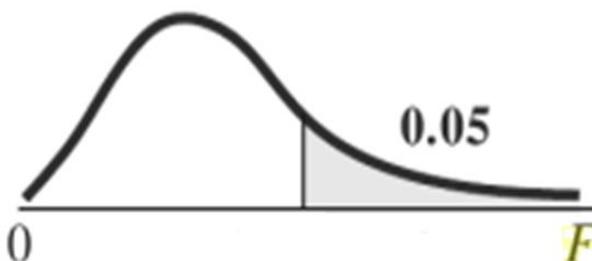


Figura N° 10: curva de distribución F con un  $\alpha = 0.05$

Para obtener el valor de F se necesitan conocer los grados de libertad del numerador y los grados de libertad del denominador.

Grados de libertad: se realizó el cálculo de los grados de libertad del numerador y del denominador de la siguiente manera:

- 1- Numerador de grados de libertad =  $k - 1$
- 2- Denominador de grados de libertad =  $k(n - 1)$

Donde  $K =$  número de muestras y  $n =$  tamaño de la muestra para el caso específico  $K = 3$  ya que se están evaluando tres temperaturas diferentes (20°C, 25°C y 30°C) y  $n = 33$  que es el número total de observaciones a evaluar (11 de cada temperatura). Por lo tanto:

Numerador de grados de libertad.  $K-1= 3-1=2$

Denominador de grados de libertad=  $K(n-1)= 3(11-1)= 30$

Obtenidos estos datos se busca el valor correspondiente en la tabla de distribución F (ver tabla de distribución de Fisher en anexo N°6) dando un valor de  $F= 3.316$

### 5.2.2.3. Cálculo del estadístico de prueba F <sup>(55)</sup>.

$$F = \frac{\text{varianza entre muestras}}{\text{varianza dentro de muestras}} = \frac{\left[ \frac{\sum ni(\bar{X}_i - \bar{X})^2}{k-1} \right]}{\left[ \frac{\sum (ni-1)s^2}{\sum (ni-1)} \right]}$$

Donde:

$\bar{x}$  = media de todos los valores muestrales que se combinan.

K = número de medias poblacionales que se comparan.

$n_i$  = número de valores en  $i$ -ésima muestra.

$\bar{X}_i$  = media de los valores en la  $i$ -ésima muestra.

$S^2_i$  = varianza de los valores en la  $i$ -ésima muestra.

Suma de cuadrados total o SC (total), es una medida de la variación total en todos los datos muestrales que se combinan.

$$- \text{SC (total)} = \sum (x - \bar{x})^2$$

La SC (total) se puede separar en los componentes de la SC (tratamiento) y la SC (error).

$$- \text{SC (total)} = \text{SC (entre muestras)} + \text{SC (error)}$$

La SC (tratamiento) o (entre muestras) es una medida de la variación entre las medias muestrales.

$$\begin{aligned} - \text{SC (entre muestras)} &= n_1(\bar{X}_1 - \bar{x})^2 + n_2(\bar{X}_2 - \bar{x})^2 + \dots + n_k(\bar{X}_k - \bar{x})^2 \\ &= \sum n_i(\bar{X}_i - \bar{x})^2 \end{aligned}$$

La SC (error), también conocida como SC (dentro de grupos) o SC (dentro de muestras), es una suma de cuadrados que representa la variación que se supone común a todas las poblaciones que se consideran.

$$SC(\text{error}) = (n_1-1) s_1^2 + (n_2-1) s_2^2 + \dots + (n_k-1) s_k^2$$

$$SC(\text{error}) = (n_i-1) s_i^2$$

Cálculo:

$$SC(\text{entre muestras}) = n_1(\bar{X}_1 - \bar{x})^2 + n_2(\bar{X}_2 - \bar{x})^2 + \dots + n_k(\bar{X}_k - \bar{x})^2$$

$$SC(\text{entre muestras}) = 11(11.27-8.75)^2 + 11(6.27-8.75)^2 + 11(8.72-8.75)^2$$

$$SC(\text{entre muestras}) = 137.733$$

$$SC(\text{error}) = (n_1-1) s_1^2 + (n_2-1) s_2^2 + \dots + (n_k-1) s_k^2$$

$$SC(\text{error}) = (11-1)12.77 + (11-1)5.07 + (11-1)11.2$$

$$SC(\text{error}) = 289.648$$

$$SC(\text{total}) = 137.733 + 289.648 = 427.381$$

Los datos obtenidos SC (entre muestras) y SC (error) son sumas de cuadrados, por lo que si se divide cada una de ellas entre su número correspondiente de grados de libertad se obtienen los cuadrados medios necesarios para la obtención de F.

$$CM(\text{entre muestras}) = \frac{SC(\text{entre muestras})}{k-1}$$

$$CM(\text{entre muestras}) = \frac{137.733}{2} = 68.87$$

$$CM(\text{error}) = \frac{SC(\text{error})}{N-k}$$

$$CM(\text{error}) = \frac{289.648}{30} = 9.65$$

$$F = \frac{CM (entre\ muestras)}{CM (error)}$$

$$F = \frac{68.87}{9.65} = 7.13$$

Al introducir los datos en los programas mencionados dieron el mismo resultado comprobándose así los valores obtenidos.

**Tabla N°12:** Resumen de resultados obtenidos para el cálculo de F.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	137.733	2	68.866	7.130	0.003
Intra grupos	289.648	30	9.654		
Total (Corr.)	427.381	32			

En la tabla N°12 se observa que el valor de  $F = 7.130$  y que el valor de  $P$  (calculado con los programas) = 0.003 y puesto que el valor  $P$  de la prueba  $F$  es menor que 0.05, y el valor  $F$  calculado es mayor que el  $F$  de tabla, se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de biomasa entre un nivel de temperatura y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Por tanto se rechazó la hipótesis nula la cual expresa que no existe diferencias entre el aumento medio de biomasa a las tres temperaturas evaluadas.

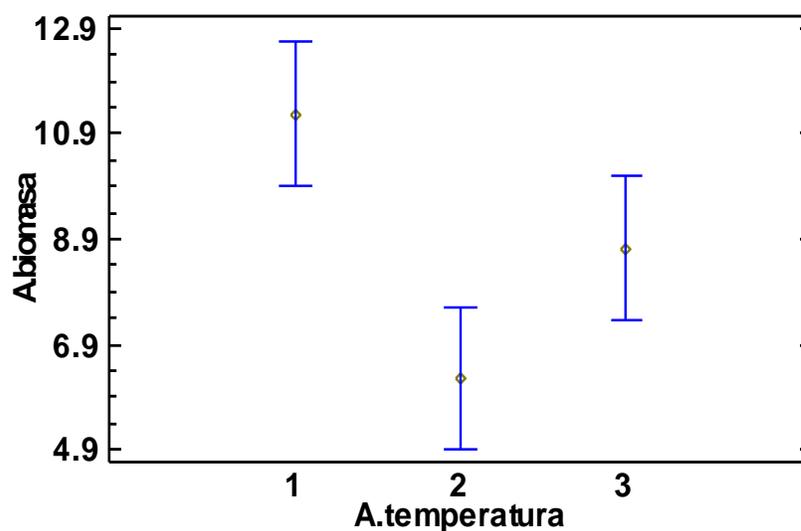
Los programas estadísticos brindaron además diferente información como la estimación por intervalo de confianza de la diferencia entre dos medias poblacionales el cual da la información necesaria para conocer qué valores se pueden esperar.

**Tabla N° 13:** Medias para biomasa por temperatura con intervalos de confianza del 95.0%

Temperatura	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
20°C	11	11.2708	0.9368	9.9178	12.6237
25°C	11	6.2668	0.9368	4.9138	7.6197
30°C	11	8.7271	0.9368	7.3742	10.0801
<b>Total</b>	33	8.7549			

La tabla N°13 muestra la media de biomasa para cada nivel de temperatura, el error estándar de cada media, Además muestra un intervalo alrededor de cada media, los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95.0% de las veces.

#### Medias y 95.0% de Fisher LSD



**Figura N°11:** Gráfico de aumento de biomasa.

En la figura N°11 se muestra la media del aumento de biomasa para cada uno de los niveles de temperatura, la cual está representada por un punto ubicado en el centro del intervalo de cada media. Se observa que los intervalos de los promedios del aumento de biomasa a una temperatura de fermentación de 20°C, 25°C y 30°C no se traslapan verticalmente, por tanto, existe diferencia significativa entre ellos. Este gráfico muestra el nivel de confianza con el que se ha hecho el análisis, es decir los intervalos con los cuales se puede trabajar.

### 5.2.3. Producto idóneo

Para determinar el producto idóneo de fermentación se toman en cuenta distintos factores que como lo son: el aumento de biomasa, la acidez titulable, las características sensoriales y una de las más importantes la temperatura. (26, 39, 47, 53, 55).

A pesar que se tomaron en cuenta los factores que podían dar lugar a resultados equívocos como lo es la renovación de la leche e inicio de la fermentación a la misma hora, la temperatura del cultivo que se procuraba se mantuviera de acuerdo a lo establecido (20°C, 25°C, 30°C), el lavado de los gránulos con la misma cantidad de agua, la agitación y la toma de pH tal y como se menciona en el numeral 4.3.4 no se obtuvieron resultados coherentes con la teoría en el producto final, en la cual la biomasa debía aumentar en mayor cantidad a una temperatura de fermentación mayor (54), y el porcentaje de acidez a la temperatura más baja debía ser menor.

Por lo que se concluye que los gránulos deben tener inestabilidad microbiológica (47), que causó que durante las fermentaciones no se obtuvieran características constantes. Esto puede deberse en parte a que con leche descremada se obtiene una mayor cantidad de biomasa que con leche entera ya que la grasa de la leche puede que inhiba el intercambio de nutrientes entre la leche y los gránulos (55), por lo que esto pudo haber provocado que hubiese una alteración interna de los gránulos.

Al no cumplir estas condiciones no se puede aplicar un método estadístico para establecer la temperatura de fermentación adecuada tal y como se tenía previsto. No obstante se observa en los resultados obtenidos que la temperatura que presenta una mayor estabilidad tanto fisicoquímica, organoléptica y microbiológica es la temperatura de 25°C lo cual coincide con la teoría y con los resultados obtenidos en las fermentaciones con leche entera.

### **5.3. Evaluación de las características sensoriales del producto (aspecto, color, sabor y apariencia) y comparación con la especificación NC-TS 457:2007.**

#### **5.3.1. Evaluación de las características sensoriales.**



**Figura N° 12:** Leche fermentada con gránulos de kéfir.

En cada una de las 36 fermentaciones (doce a 20°C, doce a 25°C y doce a 30°C) se determinaron las características sensoriales tales como aspecto, olor, sabor y textura que estable la especificación Técnica Cubana <sup>(30)</sup>.

**Tabla N° 14:** Características sensoriales de la leche fermentada a 20°C, 25°C 30°C.

<b>Características Sensoriales</b>	<b>Resultado</b>	<b>Criterio con NC-TS 457:2007</b>
Aspecto	Color blanco, uniforme.	Conforme
Olor	Típico a producto lácteo fermentado.	Conforme
Sabor	Típico a producto lácteo fermentado. Acidez leve a moderada	Conforme
Textura	Consistencia cremosa.	Conforme

Según los resultados de la tabla N°14 se puede observar que todas las fermentaciones a las diferentes temperaturas cumplen con lo establecido con la especificación Técnica Cubana (Ver Normativas en anexo N°11).

Además se observaron diferencias en las leches fermentadas a las diferentes temperaturas de fermentación, la cuales se pueden mencionar:

- Que las fermentaciones, obtenidas en las temperaturas de incubación de 30°C presentó un sabor ácido mucho más pronunciado que las demás muestras fermentadas a 25°C y 20°C.
- Las fermentaciones realizada a las temperatura de 25°C, presentó un sabor levemente ácido, y las fermentaciones realizadas a las temperaturas de 20°C presentó una acidez moderada.

Según Farnworth (2003). La temperatura y tiempo de fermentación es un factor que influye en las propiedades del producto final, cuando aumenta las concentraciones de ácido láctico aumenta el contenido de diacetil, este último otorga un sabor mantecoso, específico de la mantequilla, crema agria, en producto fermentados frescos.

En este estudio, las fermentaciones de 30°C obtuvieron los porcentajes de acidez en términos de ácido láctico mayores en comparación a las leches fermentadas a las temperaturas de 20°C y 25°C.

Este resultado afirma y explica el porqué de el sabor ácido pronunciado en las fermentaciones sometidas a 30°C, debido a que existe en ellas una mayor contenido de ácido láctico y diacetil lo cual aporta ese sabor, por lo que la temperatura de fermentación a 30°C influyó en las características del producto final.

En las fermentaciones obtenidas a 20°C se observó en su textura una mayor cremosidad en comparación de las leches fermentadas a 25°C y 30°C. A su vez el sabor era moderadamente ácido, a pesar que se obtuvieron porcentajes de acidez en términos de ácido láctico, mayores que las fermentaciones obtenidas a 25°C pero menores que las fermentaciones de 30°C.

El mejor sabor se debe a la acción algunas las bacterias ácido lácticas mesófilas porque producen pequeñas cantidades de acetaldehído, por la fermentación de citratos otorgando un sabor y aroma agradable.<sup>(45)</sup>

#### **5.4. Análisis fisicoquímico realizados a la leche fermentada (acidez titulable, humedad, sólidos totales, cenizas grasas y proteínas) y microbiológico Coliformes totales, BAL, hongos y levaduras) del producto y comparación con el CODEX STAN 243-2003.Y con la especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007.**

##### **5.4.1. Análisis Fisicoquímico.**

Se elaboraron por triplicado, muestras de leche fermentada con gránulos de kéfir obtenida a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C, se realizaron los análisis fisicoquímicos tales como acidez titulable, sólidos totales, cenizas,

grasa y proteína, como un control de calidad a la leche descremada fermentada con gránulos de kéfir. Este estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología alimentos de CENSALUD en el Laboratorio de Análisis Bromatológico y en el Laboratorio de Química Agrícola Aplicada ambos de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

#### 5.4.1.1. Acidez titulable.

**Tabla N°15:** Resultados promedios del porcentaje de acidez titulable en términos de ácido láctico en la leche descremada fermentada a 20°C, 25°C y 30°C.

Temperatura de fermentación de la muestra.	Acidez titulable (%)
20°C	0.76
25°C	0.68
30°C	0.77
<b>Promedio</b>	0.74
<b>Desviación</b>	0.05

En la tabla N°15, se puede apreciar una leve variación en el porcentaje de acidez titulable en las diferentes temperaturas, obteniéndose como resultado una desviación estándar de 0.05 valor que es despreciable <sup>(59)</sup>.

La variación probablemente sea no significativa debido a que cada muestra se fermentó hasta obtener un pH de 4.40.

La acidez titulable es el contenido de ácido láctico producido por las bacterias ácido láctica que ha fermentado la leche, lo que han desdoblado la lactosa y la caseína presente en la leche <sup>(11)</sup>.

El promedio de porcentaje de acidez titulable fue de  $(0.74 \pm 0.05)$  %, lo cual es conforme con el parámetro establecido por el CODEX lo cual especifica que se

debe de obtener un porcentaje de acidez titulable mínimo de 0.6% para el kéfir (Ver Normativas en anexo N°11).

#### 5.4.1.2. Humedad.

**Tabla N° 16:** Resultados promedio de la determinación de humedad y sólidos totales en la leche descremada fermentada a 20°C, 25°C y 30°C.

Temperatura de fermentación de la muestra.	Humedad (%)	sólidos totales (%)
20°C	92.32	7.68
25°C	92.50	7.50
30°C	92.44	7.56
Promedio	92.42	7.58
Desviación	0.09	0.09

Se observa en la tabla N°16, que la desviación estándar para el porcentaje de humedad y el porcentaje de sólidos totales es de 0.09 lo cual esta variación se vuelve despreciable <sup>(59)</sup>. Con lo que se puede decir que las muestras de kéfir a pesar que estén fermentadas a diferentes temperaturas, no existe una variación significativa, en la determinación fisicoquímica de humedad y sólidos totales.

Esta determinación no está contemplada en el CODEX para leche fermentadas, pero dicha información puede ser de mucha utilidad debido que esté análisis aporta la cantidad de agua presente en la muestra y esta influye de una manera directa en la textura y el sabor, apariencia de el producto final <sup>(54)</sup> para un producto natural las cifras del contenido de agua varía desde un 65% hasta un 95% <sup>(48)</sup>. Y el contenido de sólidos totales aporta información nutricional del alimento (contenido de proteína, grasa butírica, lactosa, minerales) <sup>(8)</sup>, por lo que puede ser útil para conocer si la leche fermentada se encuentra adulterada <sup>(54)</sup>.

La leche descremada fermentada con gránulos de kéfir su contenido de humedad fue de  $(92.42 \pm 0.09)$  %, según Santos y Vega (2012) la leche entera

fermentada con gránulos de kéfir, el contenido de humedad es de  $(89.04 \pm 0.52)$  %, lo cual indica que en la leche fermentada descremada con los gránulos de kéfir contiene mayor cantidad de agua <sup>(8)</sup>.

El contenido de sólidos totales para la leche descremada fermentada con gránulos de kéfir es de  $(7.58 \pm 0.09)$  %, y para la leche entera fermentada con los gránulos de kéfir es  $(10.96 \pm 0.52)$  %, según Santos y Vega (2012). La disimilitud entre ambos tipos de leche fermentada probablemente sea que la leche descremada fermentada con los gránulos de kéfir tiene 0% de grasa contenido graso a diferencia de la leche entera fermentada con gránulos de kéfir el contenido graso que tiene es de  $(3.31 \pm 0.34)$ % Santos y Vega (2012).

#### 5.4.1.3. Cenizas.

**Tabla N° 17:** Resultados promedios de la determinación de cenizas en la leche descremada fermentada a 20°C, 25°C y 30°C.

Temperatura de fermentación de la muestra.	Cenizas (%)
20°C	0.58
25°C	0.41
30°C	0.63
Promedio	0.54
Desviación	0.11

En la tabla N°17 se muestra que la desviación estándar para cada una de las muestras fue de 0.11 valor que es despreciable <sup>(59)</sup>. Lo cual indica que la temperatura de fermentación no afecta al contenido de cenizas presente en la muestra.

Para la leche fermentada descremada con gránulos de kéfir el contenido de cenizas fue de  $(0.54 \pm 0.01)$  %. Según Santos y Vega (2012) el contenido de

cenizas para leche entera fermentada con gránulos de kéfir fue de  $(0.69 \pm 0.01)$  %, por lo que se obtiene una diferencia mínima entre ambas leches fermentadas.

Este análisis no está contemplado para el kéfir en el CODEX STAN 243-2003, pero es muy útil debido a que determina la cantidad de materia inorgánica presente en la muestra como son los minerales (potasio, calcio, fósforo y otros) es un buen indicador de adulteraciones en un producto, debido a que se espera valores de cenizas bajos. <sup>(8)</sup>.

#### 5.4.1.4. Proteína

**Tabla N°18:** Resultados promedios del porcentaje de proteína en la leche descremada fermentada a 20°C, 25°C y 30°C.

Temperatura de fermentación de la muestra.	Proteína (%)
20°C	4.07
25°C	4.55
30°C	4.71
Promedio	4.43
Desviación	0.33

Se muestra la desviación estándar de los datos obtenidos en términos de porcentaje de proteína cuyo valor fue de 0.33 el cual se vuelve depreciable <sup>(59)</sup>.

Los resultados muestran que el porcentaje de proteína no varía significativamente en las muestras fermentadas a las diferentes temperaturas de fermentación (20°C, 25°C y 30°C). Esta determinación fisicoquímica es elemental porque mide un componente nutricional importante y es un parámetro para el CODEX de leches fermentadas cuyo mínimo porcentaje es de 2.7% de proteínas para el kéfir.

Según la tabla de composición de alimentos para Centroamérica (INCAP), La leche descremada fluida debe contener 3.37% de proteína (ver Normativas en anexo N°11).

En la leche descremada fermentada con gránulos de kéfir se obtiene un mayor porcentaje de proteína en el producto final de  $(4.43 \pm 0.33)$  % a diferencia de leche entera fermentada con gránulos de kéfir según Santos y Vega (2012) el contenido de proteína fue  $(3.22 \pm 0.28)$  % Lo cual es razonable porque ambas leches fermentadas presenta un alto contenido de proteínas fácilmente digeribles por estar parcialmente hidrolizadas <sup>(45)</sup>.

#### 5.4.1.5. Grasa.

**Tabla N°19:** Resultados de análisis de grasa por el método de Babcock.

Temperatura de fermentación de la muestra.	Grasa (%)
20°C	0
25°C	0
30°C	0
Promedio	0

El resultado en la determinación de grasas para la leche descremada fermentada con gránulos de kéfir fue de 0% de contenido graso. Información que es razonable porque la leche descremada tiene un valor de grasa mínimo <sup>(40)</sup>, y el poco contenido que contenía probablemente fue metabolizado por las bacterias ácido lácticas presentes debido a que tiene una actividad lipolítica <sup>(45)</sup>. Para Santos y Vega (2012) la leche entera fermentada con gránulos de kéfir se obtuvo un valor de  $(3.31 \pm 0.34)$  % (ver tabla N°21). La diferencia entre las dos bebidas fermentadas es que el tipo de leche que se utilizó, porque la leche entera tiene un valor mínimo de contenido graso que es 3% en cambio la leche descremada su valor es igual o menor a 0.15% <sup>(40)</sup>.

#### 5.4.2. Comparación de resultados fisicoquímicos con el CODEX STAN 243-2003 y la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007.

**Tabla N°20:** Comparación de resultados fisicoquímicos con el CODEX STAN 243-2003 y la especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007.

Requisito Químico	Especificación	Promedio	Criterio
Acidez titulable (%)	Min. 0.6 <sup>o</sup> %	0.82±0.01%	Conforme
Proteína total (%)	Min. 2.7%	4.43±0.33%	Conforme
Grasa (%)	<10 <sup>(a)</sup>	0 ± 0%	Conforme

a) Especificación de contenido graso, (%) en caso de fermentar con leche entera.

Los resultados obtenidos en las determinaciones fisicoquímicas son conforme con la Normativa internacional del CODEX para leches fermentadas, el cual indica que la bebida a base de leche descremada cumple con los requisitos químicos de calidad.

**Tabla N°21:** Comparación de requisitos químicos con leche entera fermentada con gránulos de kéfir (Santos y vega (2012) y leche descremada fermentada con gránulos de kéfir.

Requisito Químico	Especificación	Leche descremada fermentada con gránulos de kéfir	Leche entera fermentada con gránulos de kéfir
Acidez titulable (%)	Min. 0.6 <sup>o</sup> %	(0.82±0.01)%	(0.77 ± 0.01) %
Proteína total (%)	Min. 2.7%	(4.43±0.33)%	(3.22 ± 0.28) %
Grasa (%)	< 10	(0 ± 0)%	(3.31 ± 0.34) %

De acuerdo a lo resultados fisicoquímicos, se considera que el producto elaborado es una opción razonable, debido que presenta buenas características nutricionales y dietéticas, principalmente por su alto contenido de proteínas y por no poseer grasa. Sin embargo, la disminución de la grasa es perjudicial

para la aceptación de bebidas a base de leche descremada como lo es el kéfir por su influencia en el sabor y la textura <sup>(2)</sup>.

#### 5.4.3. Análisis Microbiológico.

Se elaboraron por triplicado, muestras de leche fermentada con gránulos de kéfir obtenida a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C, se les realizaron los análisis microbiológicos de recuento de Coliformes totales, recuento de bacterias ácido lácticas, recuento de hongos y levaduras. Posteriormente los resultados se compararon con los parámetros establecidos en el CODEX para Leches Fermentadas.

**Tabla N° 22:** Resultado microbiológico de muestras fermentadas a temperatura de 20°C.

Requisito Químico	Limite microbiológico	1° muestra a 20°C	2° muestra a 20°C	3 <sup>er</sup> muestra a 20°C	Criterio
Coliformes Totales	Max. ≤100 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme
Recuento de Hongos filamentosos	Max. ≤100 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme
Recuento de Levaduras	Min. 10 <sup>4</sup>	1.6x10 <sup>5</sup> UFC/g	1.0x10 <sup>5</sup> UFC/g	9.6x10 <sup>4</sup> UFC/g	Conforme
Recuento de bacterias ácido lácticas	Min. 10 <sup>7</sup>	Mayor de 6.5x10 <sup>9</sup> UFC/g	Mayor de 6.5x10 <sup>9</sup> UFC/g	Mayor de 6.5x10 <sup>9</sup> UFC/g	Conforme

**Tabla N°23:** Resultado de muestras fermentadas a temperatura de 25°C.

Requisito Químico	Limite microbiológico	1° muestra a 25°C	2° muestra a 25°C	3 <sup>er</sup> muestra a 25°C	Criterio
Coliformes Totales	Max. $\leq 100$ UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme
Recuento de Hongos filamentosos	Max. $\leq 100$ UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme
Recuento de Levaduras	Min. $10^4$	$5.0 \times 10^4$ UFC/g	$5.6 \times 10^4$ UFC/g	$6.0 \times 10^4$ UFC/g	Conforme
Recuento de bacterias ácido lácticas	Min. $10^7$	Mayor de $6.5 \times 10^9$ UFC/g	Mayor de $6.5 \times 10^9$ UFC/g	Mayor de $6.5 \times 10^9$ UFC/g	Conforme

**Tabla N° 24:** Resultado de muestras fermentadas a temperatura de 30°C.

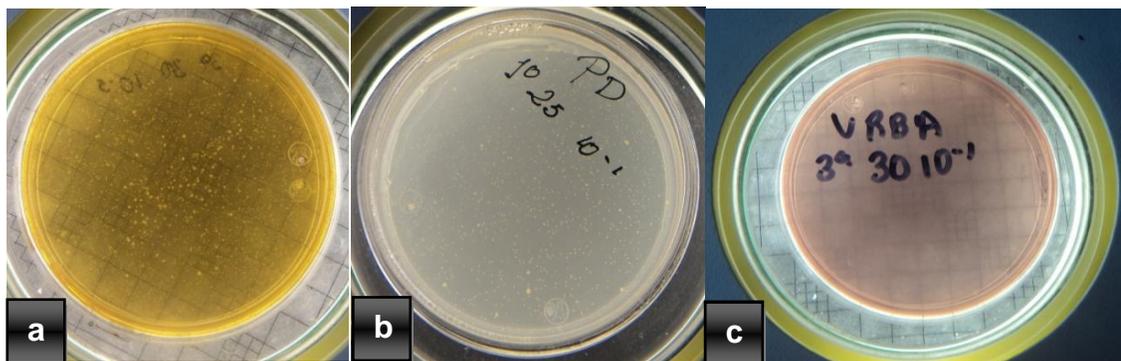
Requisito Químico	Limite microbiológico	1° muestra a 30°C	2° muestra a 30°C	3 <sup>er</sup> muestra a 30°C	Criterio
Coliformes Totales	Max. $\leq 100$ UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme
Recuento de Hongos filamentosos	Max. $\leq 100$ UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme
Recuento de Levaduras	Min. $10^4$	$3.8 \times 10^4$ UFC/g	$2.5 \times 10^4$ UFC/g	$2.0 \times 10^4$ UFC/g	Conforme
Recuento de bacterias ácido lácticas	Min. $10^7$	Mayor de $6.5 \times 10^9$ UFC/g	Mayor de $6.5 \times 10^9$ UFC/g	Mayor de $6.5 \times 10^9$ UFC/g	Conforme

Con los resultados obtenidos del análisis microbiológico, en las diferentes temperaturas de ensayo (20°C, 25°C y 30°C) según el CODEX para Leches Fermentadas CODEX STAN 243-2003, cumplen con los parámetros

establecidos, lo cual la leche fermentada con gránulos de kéfir es una bebida probiótica apta para el consumo humano.

En las tres temperaturas de fermentación (20°C, 25°C y 30°C) se puede observar que se tiene un recuento de bacterias ácido lácticas(BAL) mayor de  $6.5 \times 10^9$  UFC/g, que fueron identificadas por su morfología, como se muestra en la figura N°13, el cual eran colonias color blanco cremoso, redondas u ovaladas, pequeñas.

**Figura N°13:** Recuento de bacterias en la leche descremada fermentada con gránulos de kéfir. a) Bacterias Acido lácticas. b) Hongos y levaduras, c) Coliformes totales.



Los gránulos de kéfir contiene un gran número especies de bacterias ácido lácticas, de los géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, y *Enterococcus*, cuyas BAL se encuentran también en la leche fermentada con los gránulos de kéfir<sup>(11)</sup>.

Las BAL desempeñan un papel importante por su contribución significativa del sabor, olor, textura características sensoriales, propiedades terapéuticas, inhibición de organismos patógenos, reducción del contenido de lactosa, formación del aroma y producción de gas<sup>(45)</sup>.

También produce bacteriocinas que son componentes proteínicos antibacterianos que comúnmente preservan los alimentos.<sup>(45)</sup> Además estas bacterias son las que actúan contra las enteropatógenas comunes, con lo cual ejercen bacterias probióticas, trayendo beneficios para la salud <sup>(11)</sup>. En cuanto al recuento de levaduras se evidenció por el crecimiento de colonias color crema, lisas, brillantes y de forma ovoide, (ver figura N°13) los parámetros establecidos exigen un número mínimo el cual los resultados reflejan que diferentes temperaturas cumplen debido a que todas tienen un número mayor de  $1 \times 10^4$  UFC/g. Sin embargo, se observó una leve disminución de levaduras a medida que aumenta la temperatura de fermentación, esto podría significar que a mayor temperatura las levaduras del kéfir comienzan a morir <sup>(23)</sup>.

Las levaduras causan la generación de etanol (0.7-2.5%) y CO<sub>2</sub>, lo que contribuye en las características del producto final <sup>(23)</sup>.

Con respecto a recuento de hongos y de Coliformes totales se observó ausencia, lo que podemos asegurar que la leche fermentada en las diferentes temperaturas, se elaboró en condiciones higiénicas; ya que estos son indicadores de calidad sanitaria lo cual brinda seguridad en cuanto al consumo de esta bebida funcional.

#### **5.4.3.1. Análisis microbiológicos a materias primas.**

Antes de efectuar las fermentaciones, se realizaron análisis microbiológicos de recuento de bacterias aerobias mesófilas, a la leche descremada utilizada como materia prima. Además se realizaron análisis adicionales como el recuento de Coliformes Totales, recuento de hongos y levaduras, estos son parámetros microbiológicos que se exigen a las leches fermentadas con producto final, pero se le realizaron a la materia prima como una inspección de la carga microbiana con respecto a estos microorganismos y cuidar de la inocuidad de la leche a fermentar con los gránulos de kéfir.

**Tabla N° 25:** Resultados microbiológicos de la leche descremada UHT.

Parámetros microbiológicos	Límite máximo permitido	Resultado	Criterio
Recuento de aerobios mesófilos	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme
Coliformes Totales	Max. ≤100 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme
Hongos filamentosos	Max. ≤100 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme

Los resultados fueron comparados con los parámetros que establece el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08, del subgrupo de alimentos 1.2. y del CODEX para Leches Fermentadas CODEX STAN 243-2003 (Ver Normativas en anexo N°11). Es evidente que el producto cumple con las especificaciones por lo que se utilizó esta leche para la elaboración de la bebida fermentada con gránulos de kéfir.

También se realizaron análisis microbiológicos de recuento de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.* Además se realizaron análisis adicionales como el recuento de Coliformes Totales, recuento de hongos y levaduras, estos son parámetros microbiológicos que se exigen a las leches fermentadas con producto final, pero se le realizaron al saborizante como una inspección de la carga microbiana con respecto a estos microorganismos y cuidar de la inocuidad de las leche fermentada con los gránulos de kéfir.

**Tabla N° 26:** Resultados microbiológicos al saborizante de fresa en polvo. (Ver normativas en anexo N°11).

Parámetros microbiológicos	Límite máximo permitido	Resultado	Criterio
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 <sup>2</sup> UFC/g	<10 UFC/g	Conforme
<i>Salmonella spp /25g</i>	Ausencia	Ausencia	Conforme
Coliformes Totales	Max. ≤100 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme
Recuento de Hongos Filamentosos	Max. ≤100 UFC/g	<10 UFC/g	Conforme

En la tabla N°26 muestra los resultados que fueron comparados con los parámetros que establece el RTCA 67.04.50:08, del subgrupo de alimentos 16.3. y con el CODEX que establecen límites máximos permitidos, en el cual el saborizante de fresa en polvo, cumple con los requisitos microbiológicos. Posterior a este resultado se utilizó como saborizante en la leche fermentada con gránulos de kéfir, para la realización de la prueba hedónica.

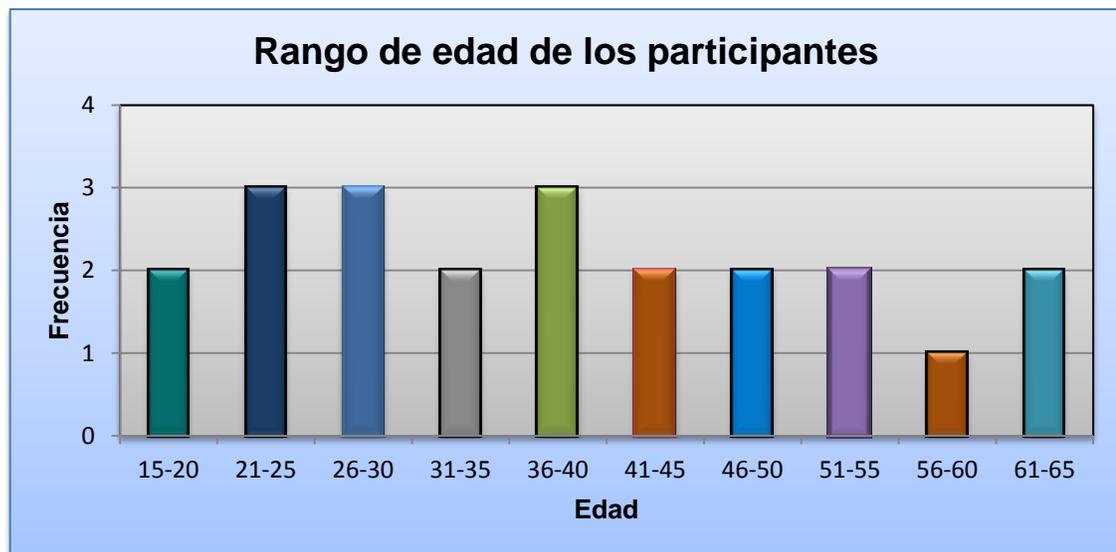
### 5.5. Evaluación del nivel de aceptación del producto idóneo de fermentación a través la prueba de aceptabilidad.

#### Prueba hedónica

Se realizó la prueba hedónica tal como se estipula en el numeral 4.3.9 a personas con edades entre 17-65 años, a las cuales se les dio a degustar el producto saborizado y sin saborizar, los datos se muestran en la tabla N° 27.

**Tabla N°27:** Edad de los participantes de la prueba hedónica.

Edad	Frecuencia	Edad	Frecuencia	Edad	Frecuencia
15-20	2	36-40	3	56-60	1
21-25	3	41-45	2	61-65	2
26-30	3	46-50	2		
31-35	2	51-55	2	<b>Total</b>	<b>22</b>



**Figura N° 14:** Rango de edad de los participantes

### 5.5.1. Sabor.

**Tabla N°28:** Resultados de sabor de las muestras 305 y 306.

Panelista	Sabor 305	Sabor 306
1	2	4
2	2	4
3	2	4
4	1	4
5	1	4
6	1	2
7	4	4
8	1	1
9	4	4
10	4	4
11	2	4
12	1	4
13	1	2
14	3	3

**Tabla N° 28continuación.**

Panelista	Sabor 305	Sabor 306
15	1	2
16	1	4
17	1	3
18	1	1
19	5	2
20	2	4
21	5	5
22		2

A cada uno de los participantes se les solicitó que evaluaran el sabor de los productos, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla N°28, en la cual se utilizó una escala de aceptabilidad de 5 puntos, a los cuales se les designaron los siguientes valores: me disgusta mucho “1”, me disgusta un poco “2”, no me gusta ni me disgusta “3”, me gusta poco “4” y me gusta mucho “5” (ver Hoja de evaluación hedónica en anexo N°16)

El análisis de los datos se realizó a través de medidas de tendencia central y t-student a fin de comprobar si hay diferencias entre los productos.

1- Planteamiento de hipótesis:

- Hipótesis nula: no existen diferencias significativas en la escala de percepción del sabor promedio entre la muestra 305 y la muestra 306.

$$H_0: \mu_{\text{sabor 305}} = \mu_{\text{sabor 306}}$$

- Hipótesis alternativa: Existen diferencias significativas en la escala en la escala de percepción del sabor promedio entre la muestra 305 y la muestra 306.

$$H_a = \mu_{\text{consistencia 305}} \neq \mu_{\text{consistencia 306}}$$

2- cálculos: se realizaron los cálculos necesarios para obtener t (ver cálculos de prueba hedónica en anexo N°18), los resultados se muestran en la tabla N°29.

**Tabla N°29:** Resumen de resultados estadísticos para la obtención de t

Cálculo	Sabor 305	Sabor 306
Suma	45	71
Suma de cuadrados	137	257
Promedio	2.1428	3.2272
Desviación estándar	1.1424	1.1518
Error estándar del promedio	0.311	0.246
Error estimado de la diferencia entre ambos grupos	0.394	

3- se estableció la zona de rechazo de  $H_0$ .

Para ello se obtuvieron los grados de libertad y el nivel de significancia

- grados de libertad =41 (Ver cálculos de prueba hedónica en anexo N°18).
- nivel de significancia  $=\alpha=0.05$  para una prueba de dos colas
- se obtuvo el valor de t de la tabla de valores críticos para la prueba t (ver tabla T-Student en anexo N°17 y tabla N°39), en donde se observa que

$$t_{vc} = \pm 2.020$$

4- se resuelve la fórmula para la prueba t (ver cálculos de prueba hedónica en anexo N°18) que dio un resultado de  $t=-2.751$

5- se decide si se acepta o se rechaza la  $H_0$

Siguiendo la regla de decisión que señala que si el valor de  $t > t_{vc}$ , entonces se rechaza la hipótesis nula. Por el contrario si el valor de  $t < t_{vc}$ , se mantiene la hipótesis nula.  $t=-2.751 < t_{vc} = \pm 2.020$

Por lo que se acepta la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas en la escala de percepción del sabor promedio entre la muestra 305 y 306.



**Figura N°15:** Percepción del sabor 305 (muestra sin saborizar).

Se puede observar que un 50% de los participantes dijeron que les disgustaba mucho el producto sin saborizar mientras solo un 9% expresó que le gustaba mucho, por lo que el sabor resulta desagradable para la mayoría de los participantes.



**Figura N°16:** Percepción del sabor 306 (muestra saborizada).

En la figura N° 16 se puede observar que solo un 9% (2 personas de las 22 evaluadas) expresó que el producto le disgustaba mucho mientras un 55% (12 personas de las 22) declaró que les gustaba un poco por lo que el producto es mejor aceptado.

Aunque según los datos obtenidos estadísticamente no hubo variación en cuanto a la percepción del sabor entre la muestra 305 (no saborizado) y 306 (saborizado) por parte de los participantes lo que probablemente se deba a que la escala es muy pequeña para notar diferencia alguna; se puede observar que según los datos mostrados en los gráficos de las figuras N°15 y N°16 la muestra 306 tuvo una mejor aceptación ya que en la 305 la mayoría (un 50%) manifestó que les disgustaba mucho el producto mientras que en la 306 la mayoría (55%) manifestaron que les gustaba poco. por lo tanto la adición de saborizante mejora la percepción y aceptación del producto ya que enmascara el sabor desagradable causado por el pH bajo.

### **5.5.2. Consistencia**

Al igual que con el sabor se les pidió a los participantes que evaluaran la consistencia de las muestras 305 (sin saborizar) y 306 (saborizado) (Ver esquema de prueba de aceptabilidad en anexo N°15) manejando los mismos parámetros utilizados en el sabor es decir la escala que va desde me disgusta mucho hasta me gusta mucho cuyos valores son me disgusta mucho “1”, me disgusta un poco “2”, no me gusta ni me disgusta “3”, me gusta poco “4” y me gusta mucho “5” (ver hoja de evaluación hedónica en anexo N°16) y que a la vez manifiestan en observaciones o sugerencias que pudieran ayudar a mejorar el producto en futuros proyectos.

**Tabla N°30:** Resultados de consistencias de muestra 305 y 306.

Panelista	Consistencia 305	Consistencia 306
1	4	4
2	4	3
3	4	4
4	4	2
5	4	2
6	4	3
7	4	4
8	4	3
9	4	3
10	4	4
11	4	5
12	4	4
13	4	2
14	4	5
15	4	3
16	4	4
17	4	3
18	4	3
19	4	3
20	4	4
21	5	4
22		4

Se efectuó el mismo procedimiento que para el sabor.

1- Planteamiento de hipótesis:

- Hipótesis nula: no existen diferencias significativas en la escala de percepción de la consistencia promedio entre la muestra 305 y la muestra

$$306. H_0: \mu_{\text{consistencia 305}} = \mu_{\text{consistencia 306}}$$

- Hipótesis alternativa: Existen diferencias significativas en la escala en la escala de percepción de la consistencia promedio entre la muestra 305 y la muestra 306.

$$H_a = \mu_{\text{consistencia 305}} \neq \mu_{\text{consistencia 306}}$$

## 2- Cálculos

**Tabla N°31:** Resumen de resultados estadísticos para la obtención de t.

Cálculo	Consistencia 305	Consistencia 306
Suma	65	76
Suma de cuadrados	235	278
Promedio	3.095	3.45
Desviación estándar	1.30	0.857
Error estándar del promedio	0.284	0.183
Error estimado de la diferencia entre ambos grupos	0.334	

3- se estableció la zona de rechazo de  $H_0$

Para ello se obtuvieron los grados de libertad y el nivel de significancia.

- grados de libertad =41 (ver cálculos de prueba hedónica en anexo N°18)
- nivel de significancia = $\alpha$ =0.05 para una prueba de dos colas
- se obtuvo el valor de t de la tabla de valores críticos para la prueba t (ver tabla T-Student en anexo N°17 tabla N°39) en donde se observa que  $t_{vc} = \pm 2.020$

4- se resuelve la fórmula para la prueba t (ver cálculos de prueba hedónica en anexo N°18) que dio un resultado de  $t = -1.07$ .

5- se decide si se acepta o se rechaza la  $H_0$

Siguiendo la regla de decisión que señala que si el valor de  $t > t_{vc}$ , entonces se rechaza la hipótesis nula. Por el contrario si el valor de  $t < t_{vc}$ , se mantiene la hipótesis nula.

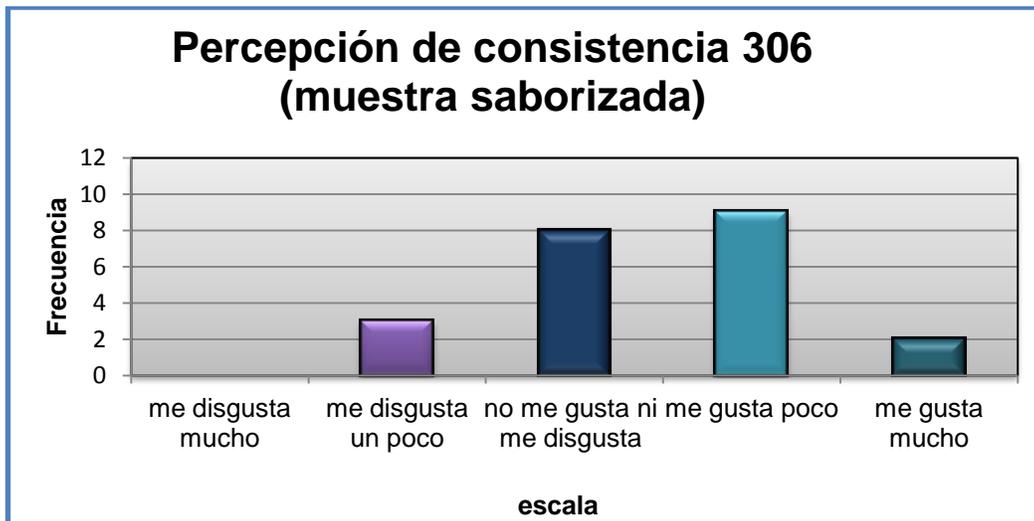
$$t = -2.751 < t_{vc} = \pm 2.020$$

Por lo que se acepta la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas en la escala de percepción de la consistencia promedio entre la muestra 305 (sin saborizar) y la muestra 306 (saborizada).



**Figura N°17:** Percepción de la consistencia 305 (muestra sin saborizar).

En la figura N°17 se observa que con respecto a la consistencia de la muestra 305 (sin saborizar) la mayor cantidad de participantes afirmó que le gustaba poco la consistencia dando a conocer en sus observaciones que hubiesen deseado que fuese más espesa.



**Figura N°18:** Percepción de la consistencia 306 (muestra sin saborizar)

En la figura N°18 se puede observar que la aceptación de la consistencia 306 (muestra saborizada) fue un poco mayor que la 305 (muestra sin saborizar), lo que probablemente haya sido influenciado por el sabor ya que no había variación alguna en la consistencia. Se observa que no hubo ningún participante que dijera que le disgustaba mucho la consistencia de la muestra saborizada; y al igual que en el sabor, aunque estadísticamente no hay diferencia entre las muestras saborizada y sin saborizar en las graficas se observa que es mejor aceptada la muestra 306 (muestra saborizada).

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## **6.0. CONCLUSIONES.**

1. Tanto el tiempo de contacto de los gránulos de kéfir con la leche descremada UHT como la temperatura de incubación influyen directamente en la acidez de la leche fermentada.
2. Los resultados obtenidos en las pruebas fisicoquímicas (acidez, grasa, proteína, humedad, sólidos totales) y las pruebas microbiológicas (coliformes, hongos y levaduras) son conformes con las especificaciones establecidas de la Norma Internacional CODEX STAN243-2003 y la Norma Técnica Cubana NC-TS 457:2007 por lo tanto es apto para el consumo humano.
3. A pesar que el mayor aumento de biomasa se obtiene a la temperatura de 20°C, el análisis estadístico muestra que existe una variabilidad del crecimiento de la biomasa de los gránulos de kéfir, sin embargo se obtuvo la desviación mínima a 25°C por lo que esta temperatura es la ideal para realizar fermentaciones con leche descremada con gránulos de kéfir en las condiciones de El Salvador si se desean crecimientos de biomasa homogéneos.
4. La consistencia de la muestra saborizada y sin saborizar era la misma, sin embargo la primera tuvo una mayor aceptación, por lo que la adición de sabor es importante debido a que mejora la percepción general del producto
5. La fermentación de gránulos de kéfir a partir de leche entera y descremada generan productos con características nutricionales similares, con la única diferencia que se obtiene una bebida fermentada

con 0% de grasa al utilizar leche descremada; lo que pudiese ser beneficioso para personas que tienen una dieta estricta a causa de enfermedades.

6. la leche fermentada con los gránulos de kéfir cuyo sabor fue modificado tuvo una mayor aceptación en cuanto al sabor y la consistencia por parte de los panelistas cuyas edades oscilaban entre los 26 a los 40 años.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES.**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. En futuras investigaciones se sugiere utilizar leche semidescremada debido a que el contenido de grasa influye directamente en el sabor y textura del producto final.
2. Promover el consumo de leche fermentada en la población salvadoreña por sus múltiples beneficios a la salud y su contribución en la prevención de enfermedades.
3. Se sugiere la adición de mucilagos regulados por Food and Drug Agency (FDA) para obtener un producto con mayor textura.
4. Impulsar investigaciones para el aislamiento de bacterias ácido lácticas debido a su importante función tanto en el proceso de fermentación como en la inhibición de bacterias patógenas.
5. Utilizar saborizantes que mejoren la aceptabilidad del producto y así implementar el consumo del mismo
6. Realizar pruebas de aceptabilidad se recomienda utilizar mayor número de parámetros de evaluación en la escala ya que así se puede obtener una diferencia más visible en la prueba de t.
7. Realizar un estudio de vida útil que permita ampliar el conocimiento acerca del producto.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alm, Livia. (1982, enero). Effect of fermentation on milk fat or swedishfermented milk products. *Dairyscience* p.p: 521-531. [En línea].  
Disponible en:<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/00220302/PIIS0022030282822297.pdf#page=1&zoom=auto,0,726>. [Acceso el 8 de abril de 2014].
2. Atamian, S.; Olabi, A. y Kebbe O. (2013). The characterization of the physicochemical and sensory properties of full-fat, reduced- fat and low-fat bovine, caprine, and ovine greek yogurt (labneh). *Foodscience&nutrition*, p.p. 164-174. [Revista en línea]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fsn3.89/pdf> [Acceso el 8 de febrero de 2014].
3. Bakhshandeh, T; Pourahmad, R; Sharifan, A y Moghimi, A. (2011). Evaluation of flavor and aroma compounds present in kéfir. *Journal of Food Biosciences and Technology*, Islamic Azad University pp.11-18. [Revista en línea].Disponible en :[http://www.sid.ir/en/VEWSSID/J\\_pdf/1023220110102.pdf](http://www.sid.ir/en/VEWSSID/J_pdf/1023220110102.pdf). [Acceso el 17 de agosto de 2014].
4. Boulder, J.F. (1993). *Leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra*. Productos frescos Transformación y tecnologías Vol.2. Zaragoza España: Editorial Acribia.
5. Castillo, R.R y Mestres J. (2004). *Productos Lácteos: Tecnología*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona: UPC. [Libro en línea]. 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 [Acceso el 13 de abril de 2014].

6. Chen, T.H.; Wang, S.Y.; Chen, K.N.; Liu, S.R.; and Chen, M.J. (2009). Microbiological and chemical properties of kéfir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kéfir grains. *American Dairy Science Association*. pp. 3002-3013. [Revista en línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19528577>. [Acceso el 13 de septiembre de 2014].
7. De Antoni, G.L. (2005). *Aspectos tecnológicos y probióticos de productos fermentados con microorganismos aislados de gránulos de kéfir*. X congreso Argentino de ciencia y tecnología de alimentos. Buenos Aires, Argentina, (paper).
8. Dirección general de promoción agraria ministerio de agricultura dirección de crianzas. (2005, Julio). *Aspectos nutricionales y tecnológicos de la leche*. [En línea]. Disponible en: [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3\\_uibd.nsf/7AE7E7AB111562710525797D00789424/\\$FILE/Aspectosnutricionalesytecnologicosdelaleche.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/7AE7E7AB111562710525797D00789424/$FILE/Aspectosnutricionalesytecnologicosdelaleche.pdf) [Acceso el 30 de marzo de 2014].
9. El consumo de yogurt podría reducir en un 28% el riesgo de diabetes tipo 2 (2014, febrero 7). Diario salud.net [En línea]. Disponible en: [http://www.diariosalud.net/index.php?option=com\\_content&task=view&id=26232&Itemid=413](http://www.diariosalud.net/index.php?option=com_content&task=view&id=26232&Itemid=413)

10. Egan, H.; Kirk, R. y Sawyer R. (1993). *Análisis Químico de Alimentos de Pearson* (5ª reimpresión). México: Editorial Continental S.A. de C.V.
11. Farnworth, E.R. (2003). *Handbook of Fermented Functional Foods*. Canadá: Series Editor G. Mazza, Ph.D. [Libro en línea]. Disponible en: [http://books.google.com/sv/books?id=gpcXqEj6gEC&pg=PA107&dq=kefir&hl=es&sa=X&ei=Pv\\_uUqWmApK1kQe8hYCoCg&ved=0CFUQ6AEwCA#v=onepage&q=kefir&f=false](http://books.google.com/sv/books?id=gpcXqEj6gEC&pg=PA107&dq=kefir&hl=es&sa=X&ei=Pv_uUqWmApK1kQe8hYCoCg&ved=0CFUQ6AEwCA#v=onepage&q=kefir&f=false). [Acceso 2 de febrero de 2014].
12. Farnworth, E.R. (2005, abril). *kéfir – a complex probiotic*. Food Science and Technology – Bulletin. Food research and development center, agricultura and agricultura and agri-food Canada. [Boletín en línea]. Disponible en: <http://www.ufrb.edu.br/kefirdoreconcavo/images/artigos/artigo06.pdf> [Acceso 13 de febrero de 2014].
13. F.D.A. Food And Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual. (BAM). E.E.U.U. [Manual en línea]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>. [Acceso 5 de marzo de 2014].
14. Feng, P; Weagant, S.D y Grant, M.A. (2002). *BAM Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Bacteriological Analytical Manual U.S.A: FDA [manual en línea]. Disponible en: [www.fda.gov/food/scienceresearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm](http://www.fda.gov/food/scienceresearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm) [Acceso el 6 de marzo de 2014].

15. Ferrer, B.; Dalmay, J. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Centro atención primaria de alaquas valencia sección nutrición, Acta pediátrica española N°3*.p.p 50-55. [En línea]. Disponible en: <http://www.inocua.org/site/Archivos/investigaciones/Alim%20funcional%20probioticos.pdf> [Acceso el 7 de abril de 2014].
16. García Garibay, Mariano; Quintero, R.A. y López Mungia. (2004). *Biotecnología Alimentaria*. Mexico D.F: Editorial Limusa grupo noriega editores. [Libro en línea]. Disponible en: [http://books.google.com.sv/books?id=2ctdvBnTa18C&pg=PA178&dq=kefir+con+leche+descremada&hl=es&sa=X&ei=DT\\_wUu7gNoikQev04HQQ&ved=0CDIQ6AEwAg#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=2ctdvBnTa18C&pg=PA178&dq=kefir+con+leche+descremada&hl=es&sa=X&ei=DT_wUu7gNoikQev04HQQ&ved=0CDIQ6AEwAg#v=onepage&q&f=false). [Acceso 5 de febrero de 2014.]
17. Garrote, G.L.; Abraham, A.G. y De Antoni, G.L. (1997, february). Preservation of kéfir grains, a comparative study. *Food Science and Technology*.p.p. 77-84. [Revista en línea]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643896901358> [Acceso el 8 de febrero de 2014].
18. Garrote, G.L.; Abraham, A.G. y De Antoni, G.L. (2001, november). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*. Volume 68, issue 04 pp. 639-652. [Revista en línea]. Disponible en: <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=100585> [Acceso el 8 de febrero de 2014].

19. Garrote, G.L.; Abraham, A.G. y De Antoni, G.L. (2010). Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. En Mozzi, F.; Raya, R.R. y Vignolo, G.M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. p.p. 327-336. 1ª ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing [Libro en línea] 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). [Acceso el 25 de marzo de 2014].
20. Gil, A. y Ruiz, M. (2010). *Tratado de nutrición, composición y calidad nutritiva de los alimentos*, tomo II, 2º edición, Madrid, España: editorial medica panamericana. [Libro en línea]. Disponible en: [http://books.google.com.sv/books?id=hcwBJ0FNvqYC&printsec=frontcover&dq=tratado+de+nutricion&hl=es&sa=X&ei=\\_K9OUDvGLGh0gGrIHwCA&ved=0CC4Q6AEwAQ#v=onepage&q=leche%20fermentada&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=hcwBJ0FNvqYC&printsec=frontcover&dq=tratado+de+nutricion&hl=es&sa=X&ei=_K9OUDvGLGh0gGrIHwCA&ved=0CC4Q6AEwAQ#v=onepage&q=leche%20fermentada&f=false) [Acceso 2 de marzo de 2014].
21. Gorzek, A.; zajsek, K. (2000). Experimental assesment of the impact of cultivation conditions on kefiran production by the mixed microflora imbedded in kéfirgrains. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. University of Maribor, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering. pp 481-486. [Revista en línea]. Disponible en: <http://www.worldcat.org/title/experimental-assessment-of-the-impact-of-cultivation-conditions-on-kefiran-production-by-the-mixed-microflora-.imbedded-in-kefir-grains/oclc/781384439>. [Acceso el 30 de julio de 2014]
22. Goršek, A. y Tramšek, M. (2007). Quantitative Examination of Process Parameters during Kefir Grain Biomass Production. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. [Revista en línea].

Disponible en: [http://www.bepress.com/cgi/viewcontent.cgi?context=ijcre&article=1409&date=&mt=MTMxMzQ0MDE1Nw==&access\\_ok\\_for m=Continue](http://www.bepress.com/cgi/viewcontent.cgi?context=ijcre&article=1409&date=&mt=MTMxMzQ0MDE1Nw==&access_ok_for m=Continue). [Acceso el 10 de febrero de 2014].

23. Goršek, A. y Tramšek, K. (2010). *Influence of temperature variations on ethanol production by kéfir grains- mathematical model development*, University of Maribor, pp. 7-12. [Revista en línea]. Disponible en: <http://www.aidic.it/ibic2010/webpapers/8Gorsek.pdf>. [Acceso el 3 de septiembre de 2014].
24. Guzel, z.; kok-tas, T.; Filiz, E.; Seydim A.C. (2011) Effect of different growth condition on biomass increase in kéfir grains. *Journal dairy science American Dairy Science Association*. Department of Food Engineering, Engineering Faculty, SuleymanDemiereUniversity. pp. 12239-1243. [Revista en línea]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/52644325/biomass-increase-in-kefir-grains> [Acceso el 30 de marzo de 2014].
25. Horwitz, W. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Vol. 2. 17<sup>th</sup> Ed. USA: AOAC International.
26. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro de investigación en nutrición y salud. (2011, agosto). *Efectos de la reducción del contenido de grasa de la leche liconsa consumida por los escolares de 6 a 17 años, sobre algunos indicadores de riesgo cardiovasculares México*: Autor [En línea]. Disponible en: <http://www.liconsa.gob.mx/wp-content/uploads/2012/10/Efectos-de-la-Reduccion-de-Grasa.pdf> [Acceso el 30 de marzo de 2014].

27. Jiménez, J.M. (2005). *Estadística para ciencias del movimiento humano*. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica. [Libro en línea]. Disponible en: <http://books.google.com/sv/books?id=cPjFVyPd5PUC&pg=PA19&dq=t+student+para+muestras+independientes&hl=es&sa=X&ei=X2oXVKOeAbSKsQTgpoLoCQ&ved=0CBoQ6AEwAA#v=onepage&q=anexo%203&f=true> [Acceso el 3 de septiembre de 2014].
28. Lain, L.M.; Malcolm, S.C.; Ariaza, J.L. (1989). *Química analítica del medio ambiente*. España: Universidad de Sevilla.
29. León pelaez, A. (2013). Estudio de la capacidad de los microorganismos del kéfir para inhibir el desarrollo fúngico y para secuestrar micotoxinas. Tesis doctoral universidad de la plata facultad de ciencias exactas departamento de ciencias biológicas. [En línea]. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/32500/Documento\\_completo\\_\\_.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/32500/Documento_completo__.pdf?sequence=1) [Acceso 1 de abril de 2014].
30. Leches fermentadas especificaciones (2007). *Especificación Técnica Cubana. Oficina Nacional de Normalización NC-TS 457:2007*. [En línea]. Disponible en: <http://www.ica.edu.cu/Normas/Alimentos/Leche/NC%20TS%20457.%20Leches%20fermentadas.%20Especific.pdf>. [Acceso el 30 de febrero de 2014].
31. Liria, M.R. (2007). *Guía para la evaluación sensorial de alimentos*, Centro Internacional de Agricultura Trópica. Lima

32. Lv, J.; Wang, L.I. (2009). Bioactive components in kefir and koumiss. Young, W. *Bioactive components in milk and dairy products*. cap 10 first. New York:wiley-blackwell. [Libro en línea]. Disponible en: [http://books.google.com.sv/books?id=VFpG2doYN7IC&pg=PA258&lp g=PA258&dq=Analie+and+Bennie+bioactive+components+in+milk+a nd+dairy+products.&source=bl&ots=YR0elj0uKr&sig=XpWFGtI7\\_UAR jajqrXauaGIDFI&hl=es&sa=X&ei=gA5QU4OFFevksATOnIKgCA&ved =0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q=Analie%20and%20Bennie%20&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=VFpG2doYN7IC&pg=PA258&lp g=PA258&dq=Analie+and+Bennie+bioactive+components+in+milk+a nd+dairy+products.&source=bl&ots=YR0elj0uKr&sig=XpWFGtI7_UAR jajqrXauaGIDFI&hl=es&sa=X&ei=gA5QU4OFFevksATOnIKgCA&ved =0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q=Analie%20and%20Bennie%20&f=false) [Acceso el 13 de abril de 2014].
33. Manzano, C.; Estupiñan, D.; Poveda, E. (2012, Marzo). Efectos clínicos de los probióticos: que dice la evidencia. Grupo de Investigación Nutrición y Salud. *Revista chilena de nutrición*. p.p 98-110. [Revista en línea]. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?s cript=sci\\_arttext&pid=S0717-75182012000100010](http://www.scielo.cl/scielo.php?scrip t=sci_arttext&pid=S0717-75182012000100010) [Acceso el 16 de marzo de 2014].
34. Maturin, L. y Peeler, J.T. (1998). *BAM: Aerobic Plate Count Bacteriological Analytical Manual*. (8<sup>a</sup> ed.). [Manual en línea]. Disponible en: <http://www.fda.gov/food/Scienceresearch/LaboratoryM ethods/Bacteriologica/AnalyticalMANualBAM/default.htm>. [Acceso 24 de febrero de 2014].
35. Metchnikoff, E. (2004). *The Prolongation of life, optimistic studies*. International longevity center, classic in longevity and aging. New York: springer publishing company. (Versión original 1908). [Libro en línea]. Disponible en: <http://books.google.com.sv/books?hl=es&lr=&id =U8bgKGVZJV0C&oi=fnd&pg=PR9&dq=Metchnikoff,+E.,+Lactic+acid +as+inhibiting+intestinal+putrefaction,+in+The+Prolongation+of+Life:+>

Optimistic+Studies,&ots=7CsCojFzJn&sig=6L0RbEosbotrlyJ9fY9Qnl\_eU#v=onepage&q&f=false [Acceso 5 de abril de 2014].

36. Moore, David S. (2000). *Estadística aplicada básica*. (2ª edición). Barcelona, España: Antoni Bosch, editor, S.A. [Libro en línea]. Disponible en: <http://books.google.com.sv/books?id=oqOCiEyEjYcC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false> [Acceso el 5 de septiembre de 2014].
37. Nájera, A.L. (2014). *Sobrevivir a la estadística en 40 páginas y con 7 ejercicios*. España: Universidad de castilla la mancha.
38. Navarro da Silva, A.; Santos, R.; Marques, M.; Rodríguez, V.; Teixeira, T. y Pérez, R. (2013). Performance of hedonic scales in sensory acceptability of strawberry yogurt. Departamento de tecnología de alimentos, Universidad Federal de Viçosa MG, Brazil. *Food quality and preference*. pp. 9-21. [Revista en línea]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950329313000499> [Acceso el 16 de marzo de 2014].
39. Norma del Codex para leches fermentadas CODEX STAN 243-2003. Disponible en: [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/..../CXS\\_243s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/..../CXS_243s.pdf) - [en línea]. Disponible en: [Acceso el 12 de febrero de 2014].
40. Norma Salvadoreña Obligatoria 67.01.01.06 "Leche cruda de vaca" NSO 67.01.01:06, productos lácteos primera revisión. El Salvador: CONACYT. [En línea]. Disponible en: <http://webquery.ujmd.edu.sv/siab>

/bvirtual/Fulltext/ADCI0000578/PF1.pdf. [Acceso el 30 de marzo de 2014].

41. Oliveira, A.; Lemos, M.; Peixoto, R.; Soares, A.; Trajano, J.; Flosi, V. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. Revista de microbiología, *Journal of the Brazilian Society for Microbiology*, São Paulo pp. 341-349. [Revista en línea]. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822013000200001&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000200001&lng=en&nrm=iso&tlng=en). [Acceso 17 de febrero de 2014].
42. Ordoñez, J.A.; Ambero, M. I.; Fernández, L. y García, M.L. (1998). *Tecnología de los alimentos*. Vol. II, Págs. 90-111. Alimentos de origen animal. Madrid: Ed. Síntesis.
43. Organización mundial de gastroenterología guías prácticas, (2008, mayo). Probióticos y prebióticos. Autor. [En línea]. 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) [Acceso 1 de abril de 2014].
44. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud. (2006). *Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*. FAO/OMS. Autor. [En línea]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf> Acceso el 20 de marzo de 2014].

45. Parra Huertas, R.A. (2010) Bacterias Acidoláticas, papel funcional en los alimentos, p.p. 96.-105 [Revista en línea]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12> .[Acceso 20 de julio de 2014]
46. Paucean, A. and Socaciu, C. (2008). *Probiotic activity of mixed cultures or kéfir's lactobacilli and non-lactose fermenting yeasts*. pp. 329-334. Bulletin University of Agriculture Science and Veterinary Medicine, Agriculture. [Boletín en línea]. Disponible en: [http://www.google.com.sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F228441366\\_Probiotic\\_activity\\_of\\_mixed\\_cultures\\_of\\_kefir%27s\\_lactobacilli\\_and\\_nonlactose\\_fermenting\\_yeasts%2Ffile%2F9fcfd50c1fb8081861.pdf&ei=JDQLU8O0BeifyQGvo4G4Dg&usq=AFQjCNE4xxksj64I4EUFDuXUs77Eftgw&sig2=4oLBTPxhVh2IHRsGIVmC0g&bvm=bv.61725948,d.aWc](http://www.google.com.sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F228441366_Probiotic_activity_of_mixed_cultures_of_kefir%27s_lactobacilli_and_nonlactose_fermenting_yeasts%2Ffile%2F9fcfd50c1fb8081861.pdf&ei=JDQLU8O0BeifyQGvo4G4Dg&usq=AFQjCNE4xxksj64I4EUFDuXUs77Eftgw&sig2=4oLBTPxhVh2IHRsGIVmC0g&bvm=bv.61725948,d.aWc). [Acceso 13 de febrero de 2014].
47. Paucean, M.; Rotar, M.A.; Jimborean, M.; Mudura, E. y Socaciu, C. (2009). *Microbiological interactions between lactic acid bacteria and saccharomyces cerevisiae brewer's yeast in mixed cultura for effective production of a kéfir type product*. Journal of agroalimentary processes and technologies. pp. 283-286. [Revista en línea]. Disponible en: [http://journalofagroalimentary.ro/admin/articole/33745L19\\_Paucean\\_Adriana\\_283-286.pdf](http://journalofagroalimentary.ro/admin/articole/33745L19_Paucean_Adriana_283-286.pdf). [Acceso el 12 de septiembre de 2014].
48. Pérez Cabrejas, D. y Sánchez, L. *Leches fermentadas: aspectos nutritivos, tecnológicos y probióticos más relevantes*. Departamento de producción animal y ciencia de los alimentos, universidad de Zaragoza, agencia aragonesa de seguridad alimentaria. [En línea].

Disponible en:[http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Seguridad\\_Agroalimentaria/Agencia\\_Aragonesa\\_Seguridad\\_Alimentaria/Dictámenes\\_informes/AASA/LECHES\\_FERMENTADAS.pdf](http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Seguridad_Agroalimentaria/Agencia_Aragonesa_Seguridad_Alimentaria/Dictámenes_informes/AASA/LECHES_FERMENTADAS.pdf)  
[Acceso el 8 de abril de 2014].

49. Pinzón Fernández, A. (2006). *Determinación del índice de bacterias mesófilas aerobias presentes en la leche cruda versus leche pasteurizada que se comercializan en la zona urbana de la ciudad de Popayán*. Universidad Nacional Abierta y A Distancia, Facultad de Ciencias Agrarias. Colombia.
50. Pogačić, T.; Šinko, S.; Zamberlin, Š. Y Samaržija, D. (2013). Microbiota of kéfir grains. Faculty of agriculture university of Zagreb. *department of dairy science*, croatia pp. 3-14. [Revista en línea]. Disponible en:<http://www.google.com/sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CD0QFjAC&url=http%3A%2F%2Fhrca.k.srce.hr%2Ffile%2F144662&ei=4XVPU467OMXp0gHNklGoAw&usq=AFQjCNG0hBLGbm4un3Ed8g7amQ1YEdw1g&sig2=p4Qg42sg2U2X7qrGbqGKng&bvm=bv.64764171,d.dmQ> [Acceso 17 de febrero de 2014].
51. Proyecto occidente ganadero/TechnoServe (2010). *Manual de procedimientos para análisis de calidad de la leche*. Nicaragua: autor.
52. Quintana López, Alida V. (2011). Caracterización físicoquímica y nutricional de leches fermentadas de cabra. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Facultad de Farmacia. Departamento de nutrición y bromatología. [En línea]. Disponible en:<http://digibug.ugr.es/>

bitstream/10481/19969/1/20153089.pdf. [Acceso 13 de febrero de 2014].

53. Reglamento técnico centroamericano RTCA 67.04.50:08. Alimentos. criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. Anexo de resolución.n°.243– 2009. [En.línea]. Disponible en: [http://usam.salud.gob.sv/archivos/pdf/reglamentos/Resolucion\\_243-2009.pdf](http://usam.salud.gob.sv/archivos/pdf/reglamentos/Resolucion_243-2009.pdf). [Acceso el 3 de marzo de 2014].

54. Santos Rosa, A.G.; Vega R, Damaris S.(2012) *Estandarización del proceso de fermentación de leche entera ultrapasteurizada con gránulos de kéfir*. Tesis para optar al grado de licenciatura. Universidad De El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. Pág. 29 a 31. [En línea]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/156041002/Estandarizacion-del-proceso-de-fermentacion-de-leche-entera-ultrapasteurizada-con-granulos-de-kefir>. [Acceso 7 de febrero de 2014].

55. Schoevers, A.; Britz, T.J. (2003). *Influence of different culturing conditions on kéfir grain increase* .departmet of Food Science, University of Stellenbosch. pp. 183-187. [Revista en línea]. Disponible en:[http://www.google.com.sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F227684498\\_Influence\\_of\\_different\\_culturing\\_conditions\\_on\\_kefir\\_grain\\_increase%2Flinks%2F0deec5183508f8c63900000&ei=\\_SsyVMLeIYmPNs6HgYgE&usg=AFQjCNEW7\\_OkALbEQGHGzjSPUVpKOoy2aA&sig2=YF6YR5GFYHYg3DEFGAvzIQ&bvm=bv.76802529,d.eXY](http://www.google.com.sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F227684498_Influence_of_different_culturing_conditions_on_kefir_grain_increase%2Flinks%2F0deec5183508f8c63900000&ei=_SsyVMLeIYmPNs6HgYgE&usg=AFQjCNEW7_OkALbEQGHGzjSPUVpKOoy2aA&sig2=YF6YR5GFYHYg3DEFGAvzIQ&bvm=bv.76802529,d.eXY). [Acceso el 25 de agosto de 2014].

56. Semih, O. y Cagindi, O. (2003). kéfir: a probiotic dairy composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan journal of nutrition*. Food Engineering department, engineering faculty, ege university. p.p 54-59. [Revista en línea]. Disponible en: <http://www.kefir.ilbello.com/articoli/kefir.pdf> [Acceso 11 de abril de 2014].
57. Skoog, D A. y West, D. M. (2002). *introducción a la química analítica*. España: Editorial reverté. (versión original 1986) [Libro en línea]. Disponible en: <http://books.google.com.sv/books?id=HYxVZIYkk-MC&pg=PA54&dq=regla+4+de+estadística&hl=es&sa=X&ei=alwJVOnEDsOSsQTtjoLgAg&ved=0CBoQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>. [Acceso el 10 de septiembre de 2014].
58. Toba, T.; Uemura, H. y Mukai, T. (1991). A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing *Lactobacillus Kefiranociens*, isolated from kéfir grains, *Journal Dairy*, pp. 497-502.
59. Triola, MF. (2004). *Estadística* novena edición. México: pearson educación.
60. Zubillaga, M.; Weill, R. and Postaire, E. (2001). *Efect of probiotics and functional foods and their use in different diseases* pág. 569-579. U.S.A.: Blackwell Publishing.

## GLOSARIO.

- **Albumina:** proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre, y una de las más abundantes en el ser humano. Es sintetizada en el hígado. La albúmina es fundamental para el mantenimiento de la presión oncótica, necesaria para la distribución correcta de los líquidos corporales entre el compartimento intravascular y el extravascular, localizado entre los tejidos <sup>(17)</sup>.
- **Alimento funcional:** alimentos que, además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedad<sup>(11)</sup>.
- **Anaerobio:** se dice del microorganismo capaz de crecer o de metabolizar en ausencia de oxígeno libre; puede ser facultativo u obligado. <sup>(51)</sup>
- **Antibiótico:** drogas producidas por un microorganismo, que inhiben el desarrollo o provocan la muerte de otros microorganismos <sup>(38)</sup>.
- **Bacteriocinas:** son péptidos microbianos de reducido tamaño sintetizadas ribosomalmente, codificadas por plásmidos y liberadas extracelularmente, las cuales tienen un efecto bactericida o bacteriostático sobre otras especies (usualmente familiares)<sup>(45)</sup>.
- **Calostro:** es la leche de la vaca que no se considera apta para consumo humano, producto obtenido de los quince días anteriores y ocho posteriores del parto<sup>(51)</sup>.
- **Cultivo:** promover intencionalmente el desarrollo de este en medios de cultivo y condiciones de laboratorio controlada.<sup>(11)</sup>

- **Estéril:** exento de cualquier organismo vivo.<sup>(13)</sup>
- **Fermentación:** proceso en el cual un microorganismo transforma alimentos en otros productos, habitualmente a través de la producción de ácido láctico, etanol, y otros productos finales metabólicos <sup>(11)</sup>.
- **Fermentos lácticos:** son un medio de aporte de ácido láctico como así también una fuente de bacterias activas capaces de multiplicarse. Se utilizan en la elaboración de productos lácteos acidificados o fermentados, como también en la fabricación de manteca y quesos. Contribuyen a las propiedades y calidades de los alimentos <sup>(11)</sup>.
- **Homogenización:** Es el proceso mediante el cual se fraccionan los glóbulos de grasa de la leche para una distribución más uniforme, evitando una separación visible de la grasa en el producto.<sup>(44)</sup>
- **Inocuo:** Es todo producto que se encuentra libre de agentes químicos, físicos y microbiológicos que puedan afectar la salud y causar enfermedad.  
<sup>(49)</sup>
- **Lecheultra hightemperature (UHT):**Eleva la temperatura de la leche a por lo menos 280° F durante dos segundos, seguido de un rápido enfriamiento. La leche pasteurizada UHT empacada de forma aséptica resulta en un producto "de vida de anaquel estable" que no requiere de refrigeración hasta que se abre. <sup>(44)</sup>
- **Liofilización:** liofilización es un conjunto de procesos no solo el secado y en ello el material resultante se presentará seco, pero con todas las características del producto original forma, color, aroma, sabor y textura

estarán preservados en el producto seco. Eso diferencia y destaca el proceso de liofilización de los otros utilizados en deshidrataciones <sup>(3, 4)</sup>.

- **Pasteurización:** es el uso del calor a una temperatura suficiente para desactivar los organismos patógenos importantes en líquidos como agua o leche, pero a una temperatura inferior a la que se necesita para garantizar la esterilización <sup>(4)</sup>.
- **pH:** medida de la acidez o la alcalinidad de una solución; se define como el logaritmo negativo de la actividad de los iones H (pH de 7.0 es neutro; menos de 7.0 es ácido y más de 7.0 alcalino). <sup>(51)</sup>
- **Polisacárido:** Son biomoléculas que se encuadran entre los glúcidos y están formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos y cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales. Los polisacáridos son cadenas, ramificadas o no, de más de diez monosacáridos <sup>(24, 33)</sup>.
- **UFC:** Unidad formadora de colonia. <sup>(13)</sup>

## **ANEXOS**

**ANEXO N° 1**

**Número de infecciones intestinales atendidas en el MINSAL en el período de enero 2012- diciembre 2013.**

**Tabla N° 32:** Infecciones intestinales atendidas por el MINSAL en el período de enero 2012-diciembre 2013.

Código	Diagnóstica	Masculino	Femenino	Total
A09	Diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso	18,586	45,460	64,046
A06.9	Amebiasis, no especificada	3,423	12,011	15,434
A06.0	Disentería amebiana aguda	3,010	10,030	13,040
A07.1	Giardiasis [Iambiasis]	694	2,152	2,846
A06.1	Amebiasis intestinal crónica	143	567	710
A02.0	Enteritis debida a Salmonella	238	328	566
A04.9	Infección intestinal bacteriana, no especificada	162	396	558
A01.0	Fiebre tifoidea	137	205	342
A06.2	Colitis amebiana no disentérica	51	273	324
A05.9	Intoxicación alimentaria bacteriana, no especificada	114	150	264
A06.8	Infección amebiana de otras localizaciones	62	201	263
A06.3	Ameboma intestinal	22	142	164
A08.4	Infección intestinal viral, sin otra especificación	23	71	94
A03.9	Shigelosis de tipo no especificado	27	33	60
A02.9	Infección debida a Salmonella, no especificada	21	35	56
A07.9	Enfermedad intestinal debida a protozoarios, no especificada	7	29	36
A04.4	Otras infecciones intestinales debidas a Escherichia coli	11	24	35
A07.8	Otras enfermedades intestinales especificadas debidas a protozoarios	8	27	35
A04.8	Otras infecciones intestinales bacterianas especificadas	8	11	19
A08.1	Gastroenteropatía aguda debida al agente de Norwalk	3	14	17
A08.3	Otras enteritis virales	4	10	14
A07.0	Balantidiasis	4	9	13
A05.0	Intoxicación alimentaria estafilocócica	4	7	11
A06.4	Absceso amebiano del hígado	2	7	9
A03.0	Shigelosis debida a Shigella dysenteriae	3	5	8
A02.2	Infecciones localizadas debidas a Salmonella	1	6	7
A06.7	Amebiasis cutánea	1	5	6
A08.2	Enteritis debida a adenovirus	1	4	5
A01.1	Fiebre paratifoidea A	2	3	5
A01.4	Fiebre paratifoidea, no especificada	1	3	4
A03.8	Otras shigelosis	1	3	4
A02.1	Septicemia debida a Salmonella	1	3	4
A04.7	Enterocolitis debida a Clostridium difficile	1	2	3
A04.0	Infección debida a Escherichia coli enteropatógena	0	2	2
A00.9	Cólera, no especificado	1	1	2
A04.1	Infección debida a Escherichia coli enterotoxigena	1	1	2
A08.0	Enteritis debida a rotavirus	0	2	2
A07.2	Criptosporidiosis	0	2	2
A03.1	Shigelosis debida a Shigella flexneri	0	1	1
A08.5	Otras infecciones intestinales especificadas	1	0	1
A05.8	Otras intoxicaciones alimentarias debidas a bacterias especificadas	1	0	1
<b>Total</b>		<b>26,780</b>	<b>72,235</b>	<b>99,015</b>

Fuente: Sistema de Morbimortalidad en Línea (SIMMOW)



**Tabla N° 32: Continuación.**

Código	Diagnóstico	Masculino	Femenino	Total
A09	Diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso	18,829	44,934	63,763
A06.9	Amebiasis, no especificada	2,931	10,842	13,773
A06.0	Disentería amebiana aguda	2,641	9,064	11,705
A07.1	Giardiasis [Iambliasis]	581	1,983	2,564
A04.9	Infección intestinal bacteriana, no especificada	255	511	766
A06.1	Amebiasis intestinal crónica	136	551	687
A02.0	Enteritis debida a Salmonella	237	326	563
A01.0	Fiebre tifoidea	140	197	337
A06.2	Colitis amebiana no disintérica	41	205	246
A05.9	Intoxicación alimentaria bacteriana, no especificada	100	120	220
A06.8	Infección amebiana de otras localizaciones	26	120	146
A04.8	Otras infecciones intestinales bacterianas especificadas	22	114	136
A08.4	Infección intestinal viral, sin otra especificación	21	50	71
A06.3	Ameboma intestinal	15	39	54
A02.9	Infección debida a Salmonella, no especificada	16	23	39
A07.9	Enfermedad intestinal debida a protozoarios, no especificada	8	18	26
A07.8	Otras enfermedades Intestinales especificadas debidas a protozoarios	1	23	24
A03.9	Shigelosis de tipo no especificado	6	14	20
A06.7	Amebiasis cutánea	0	11	11
A08.3	Otras enteritis virales	5	5	10
A07.0	Balantidiasis	2	8	10
A01.4	Fiebre paratifoidea, no especificada	2	5	7
A02.8	Otras infecciones especificadas como debidas a Salmonella	3	4	7
A06.4	Absceso amebiano del hígado	0	7	7
A08.5	Otras infecciones intestinales especificadas	0	6	6
A02.2	Infecciones localizadas debidas a Salmonella	3	2	5
A03.8	Otras shigelosis	3	2	5
A01.1	Fiebre paratifoidea A	3	2	5
A02.1	Septicemia debida a Salmonella	2	3	5
A04.0	Infección debida a Escherichia coli enteropatígena	2	2	4
A08.2	Enteritis debida a adenovirus	1	1	2
A04.1	Infección debida a Escherichia coli enterotoxígena	0	2	2
A05.0	Intoxicación alimentaria estafilocócica	1	1	2
A04.4	Otras infecciones intestinales debidas a Escherichia coli	1	1	2
A03.0	Shigelosis debida a Shigella dysenteriae	0	1	1
A01.3	Fiebre paratifoidea C	1	0	1
A05.2	Intoxicación alimentaria debida a Clostridium perfringens [Clostridium	1	0	1
A08.1	Gastroenteropatía aguda debida al agente de Norwalk	1	0	1
<b>Total</b>		<b>26,037</b>	<b>69,197</b>	<b>95,234</b>

Fuente: Sistema de Morbimortalidad en Línea (SIMMOW)



Tabla N° 32: Continuación.

Código	Diagnóstico	Masculino	Femenino	Total
A09	Diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso	18,586	45,460	64,046
A06.9	Amebiasis, no especificada	3,423	12,011	15,434
A06.0	Disenteria amebiana aguda	3,010	10,030	13,040
A07.1	Giardiasis [lambliasis]	694	2,152	2,846
A06.1	Amebiasis intestinal crónica	143	567	710
A02.0	Enteritis debida a Salmonella	238	328	566
A04.9	Infección intestinal bacteriana, no especificada	162	396	558
A01.0	Fiebre tifoidea	137	205	342
A06.2	Colitis amebiana no disintérica	51	273	324
A05.9	Intoxicación alimentaria bacteriana, no especificada	114	150	264
A06.8	Infección amebiana de otras localizaciones	62	201	263
A06.3	Ameboma intestinal	22	142	164
A08.4	Infección intestinal viral, sin otra especificación	23	71	94
A03.9	Shigelosis de tipo no especificado	27	33	60
A02.9	Infección debida a Salmonella, no especificada	21	35	56
A07.9	Enfermedad intestinal debida a protozoarios, no especificada	7	29	36
A04.4	Otras infecciones intestinales debidas a Escherichia coli	11	24	35
A07.8	Otras enfermedades intestinales especificadas debidas a protozoarios	8	27	35
A04.8	Otras infecciones intestinales bacterianas especificadas	8	11	19
A08.1	Gastroenteropatía aguda debida al agente de Norwalk	3	14	17
A08.3	Otras enteritis virales	4	10	14
A07.0	Balantidiasis	4	9	13
A05.0	Intoxicación alimentaria estafilocócica	4	7	11
A06.4	Absceso amebiano del higado	2	7	9
A03.0	Shigelosis debida a Shigella dysenteriae	3	5	8
A02.2	Infecciones localizadas debidas a Salmonella	1	6	7
A06.7	Amebiasis cutánea	1	5	6
A08.2	Enteritis debida a adenovirus	1	4	5
A01.1	Fiebre paratifoidea A	2	3	5
A01.4	Fiebre paratifoidea, no especificada	1	3	4
A03.8	Otras shigelosis	1	3	4
A02.1	Septicemia debida a Salmonella	1	3	4
A04.7	Enterocolitis debida a Clostridium difficile	1	2	3
A04.0	Infección debida a Escherichia coli enteropatogena	0	2	2
A00.9	Cólera, no especificado	1	1	2
A04.1	Infección debida a Escherichia coli enterotoxigena	1	1	2
A08.0	Enteritis debida a rotavirus	0	2	2
A07.2	Criptosporidiosis	0	2	2
A03.1	Shigelosis debida a Shigella flexneri	0	1	1
A08.5	Otras infecciones intestinales especificadas	1	0	1
A05.8	Otras intoxicaciones alimentarias debidas a bacterias especificadas	1	0	1
<b>Total</b>		<b>26,780</b>	<b>72,235</b>	<b>99,015</b>

Fuente: Sistema de Morbimortalidad en Línea (SIMMOW)



**ANEXO N° 2**

**Esquema de procedimiento general.**

**Anexo N°2: Esquema de procedimiento general.**



**Figura N°19: Esquema de procedimiento general.**

### **ANEXO N° 3**

**Esquema de procedimientos de producción inicial, adaptación de los  
gránulos de kéfir, y obtención de leche fermentada a partir de la  
leche descremada UHT con los gránulos de kéfir.**



Descongelar a temperatura ambiente los gránulos de kéfir.



Lavar con 25mL de agua estéril y determinar su biomasa inicial.



Inocular la leche descremada con los gránulos en una relación 1:10 y medir el pH inicial.



Inocular la leche descremada con los gránulos en una relación 1:10 y medir pH.

Determinar: biomasa final, pH y acidez titulable a la leche fermentada.



Incubar a 25 °C durante 8 horas.



Incubar a 25°C durante 14 horas.

Repetir el proceso hasta obtener la cantidad necesarias de gránulos de kéfir.

**Figura N°20: Producción inicial de gránulos de kéfir a nivel de Laboratorio** (18,22).



La biomasa que se obtenga de la activación.



Repartir los gránulos en 3 porciones de igual peso.



Realizar el proceso en 2 veces consecutivas.



Realizar el proceso de anterior: 20 °C, 25 °C y 30 °C respetivamente.



**Figura N°21: Adaptación de los gránulos de kéfir** <sup>(18,22)</sup>.



pesar 10 g  
obtenidos de las  
temperaturas de  
ensayo.



Inocular cada grupo de  
gránulos en 100 mL de  
leche descremada.



Incubar una preparación  
a 20 °C, otra a 25 °C y  
otra a 30 °C.



Medir pH inicial y cada 3  
horas a cada preparación  
hasta obtener pH entre  
4.2.a 4.6.



Determinar:  
-biomasa final  
-pH  
-acidez titulable  
-características  
organolépticas a la  
leche fermentada



Almacenar cada  
porción de gránulos  
en un nuevo volumen  
de leche, (4°C)  
colocar en la  
temperatura de  
incubación que  
corresponda.



Realizar 12  
fermentaciones  
consecutivas.

**Figura N°22: Obtención de leche fermentada a partir de la leche descremada UHT con los gránulos de kéfir a 20°C, 25 °C y 30°C (18,22).**

## **ANEXO N° 4**

**Determinación del número de muestras.**

Se determinó el número de fermentaciones necesarias, para cada una de las temperaturas, utilizando el muestreo aleatorio simple, empleando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2_{\alpha/2} S^2}{\epsilon^2}$$

n= tamaño de la muestra.

$Z_{\alpha/2}$ = margen de confiabilidad.

S= desviación estándar de la población conocida o estimada a partir de anteriores estudios o de una prueba piloto.

$\epsilon$ = margen de error deseado.

En esta fórmula indica que el tamaño de muestra depende del nivel de confianza deseado, del margen de error deseado y del valor de la desviación estándar, estimada a partir de anteriores estudios o de una prueba piloto.<sup>(59)</sup>

**Tabla N °33:** Niveles de confianza y valores críticos.

Nivel confianza	$\alpha$	Valor crítico Z $\alpha/2$
90%	0.10	1.645
95%	0.05	1.96
99%	0.01	2.575

Este muestreo se decidió realizar con un nivel de confianza del 95% obteniéndose un valor de Z= 1.96, tomado de la tabla N°33, el margen de error que se utilizado fue de 3.

En la tabla N° 11, muestra desviaciones estándar del aumento de la biomasa obtenidas en las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C, el cual se utilizó la

desviación estándar mayor que es 3.57 que corresponde a la temperatura de 20°C.

Sustituyendo los valores en la fórmula se obtiene:

$$n = (1.96)^2(3.57)^2/(3)^2$$

$$n = 5.44$$

Aplicando la regla de redondeo <sup>(59)</sup>

$$n = 6$$

Por lo tanto se necesitaba realizar 6 muestras de leche fermentada para cada temperatura, lo cual indica que se realizó el doble del número de muestras para el presente trabajo de investigación.

**ANEXO N° 5**

**Hojas de control por temperatura.**



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**  
**CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN SALUD**  
**BIOTECNOLOGIA**

Temperatura de fermentación: 20°C      Fecha de análisis: \_\_\_\_\_

Control de mantenimiento de temperatura de fermentación del equipo

Hora de inicio	Temperatura	hora Final	temperatura

Determinación de biomasa y porcentaje de acidez a temperatura de fermentación de 20°C.

Código de muestra	Inicial	Hora	Final	Hora	Aumento de biomasa (g)	mL de NaOH gastados	% acidez

Características sensoriales de la leche fermentada.

determinación	observación
- Color	
- Olor	
- Sabor	
- Consistencia	
- Aspecto	



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**  
**CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN SALUD**  
**BIOTECNOLOGIA**

Temperatura de fermentación: 25°C      Fecha de análisis: \_\_\_\_\_

Determinación de biomasa y porcentaje de acidez a la temperatura de fermentación de 25°C.

código de la muestra	Inicial	Hora	Final	Hora	Aumento de biomasa (g)	mL de NaOH gastados	% acidez

Determinación de cambios de pH a las diferentes temperaturas de fermentación

Tiempo de fermentación (horas)					Tiempo real de fermentación
0	2	6	7	8	
Horas	horas	horas	horas	horas	

Características sensoriales de la leche fermentada.

determinación	observación
- Color	
- Olor	
- Sabor	
- Consistencia	
- Aspecto	



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**  
**CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN SALUD**  
**BIOTECNOLOGIA**

Temperatura de fermentación: 30°C      Fecha de análisis: \_\_\_\_\_

Determinación de biomasa y porcentaje de acidez a la temperatura de fermentación de 30°C.

código de la muestra	Inicial	Hora	Final	Hora	Aumento de biomasa (g)	mL de NaOH gastados	% acidez

Determinación de cambios de pH a las diferentes temperaturas de fermentación

Tiempo de fermentación (horas)					Tiempo real de fermentación
0	2	6	7	8	
Horas	horas	horas	horas	horas	

Características sensoriales de la leche fermentada.

determinación	observación
- Color	
- Olor	
- Sabor	
- Consistencia	
- Aspecto	

**ANEXO N° 6**

**Tabla de Distribución de Fisher**

**Tabla N° 34:** Distribución de F de Fisher

alfa = .05		Valores críticos para la distribución F de Fisher .05 = P(F > f) = área a la derecha de f bajo la función de densidad F									
		F ~ F(dfn,dfd)									
		grados de libertad del numerador (dfn)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
grados de libertad del denomin. (dfd)	1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88
	2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40
	3	10.13	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

**Tabla N°34:** Continuación

alfa = .05		Valores críticos para la distribución F de Fisher .05 = P(F > f) = área a la derecha de f bajo la función de densidad F									
		F ~ F(dfn,dfd)									
		grados de libertad del numerador (dfn)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
grados de libertad del denomin. (dfd)	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
	26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22
	27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20
	28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19
	29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18
	30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16
	31	4.16	3.30	2.91	2.68	2.52	2.41	2.32	2.25	2.20	2.15
	32	4.15	3.29	2.90	2.67	2.51	2.40	2.31	2.24	2.19	2.14
	33	4.14	3.28	2.89	2.66	2.50	2.39	2.30	2.23	2.18	2.13
	34	4.13	3.28	2.88	2.65	2.49	2.38	2.29	2.23	2.17	2.12
	35	4.12	3.27	2.87	2.64	2.49	2.37	2.29	2.22	2.16	2.11
	36	4.11	3.26	2.87	2.63	2.48	2.36	2.28	2.21	2.15	2.11
	37	4.11	3.25	2.86	2.63	2.47	2.36	2.27	2.20	2.14	2.10
	38	4.10	3.24	2.85	2.62	2.46	2.35	2.26	2.19	2.14	2.09
	39	4.09	3.24	2.85	2.61	2.46	2.34	2.26	2.19	2.13	2.08
	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
	100	3.94	3.09	2.70	2.46	2.31	2.19	2.10	2.03	1.97	1.93
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	
inf	3.84	3.00	2.61	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	

**ANEXO N° 7**  
**Cálculos Estadísticos.**

## Cálculos

Ejemplo de cálculo de porcentaje de biomasa.

$$\text{Porcentaje de aumento de biomasa} = \frac{\text{aumento de biomasa}}{\text{biomasa inicial}} * 100.$$

$$\text{Porcentaje de aumento de biomasa} = \frac{0.3 \text{ g}}{10.0} = 0.03 * 100 = 3\%$$

Cálculos estadísticos.

- sumatoria

$$\sum_{305} = 2+2+2+\dots\dots\dots+5+2+5 = 45$$

$$\sum_{306} = 4+4+4+\dots\dots\dots+4+5+2 = 71$$

- suma de cuadrados

$$\sum_{305}^2 = 2^2+2^2+2^2+\dots\dots\dots+5^2+2^2+5^2 = 137$$

$$\sum_{306}^2 = 4^2+4^2+4^2+\dots\dots\dots+4^2+5^2+2^2 = 257$$

- Promedio

$$\bar{X}_{305} = \sum_{305} / n_{305}$$

$$\bar{X}_{305} = 45/21 = 2.1428$$

$$\bar{X}_{306} = \sum_{306} / n_{306}$$

$$\bar{X}_{306} = 71/22 = 3.2272$$

- desviación estándar

$$S_{305} = \sqrt{\frac{\sum_{305}^2 - [(\sum_{305})^2 / n_{305}]}{n_{305} - 1}}$$

$$S_{305} = \sqrt{\frac{137 - [(45)^2 / 21]}{21 - 1}}$$

$$S_{305} = \sqrt{2.028}$$

$$S_{305} = 1.424$$

$$S_{306} = \sqrt{\frac{\sum_{306}^2 - [(\sum_{306})^2 / n_{306}]}{n_{306} - 1}}$$

$$S_{306} = \sqrt{\frac{257 - [(71)^2 / 22]}{22 - 1}}$$

$$S_{306} = 1.1518$$

- error estándar del promedio

$$s\bar{X}_{305} = \frac{S_{305}}{\sqrt{n_{305}}}$$

$$s\bar{X}_{305} = \frac{1.424}{\sqrt{21}}$$

$$s\bar{X}_{305} = \frac{1.424}{4.582} = 0.311$$

$$s\bar{X}_{306} = \frac{S_{306}}{\sqrt{n_{306}}}$$

$$s\bar{X}_{305} = \frac{1.1518}{\sqrt{22}}$$

$$s\bar{X}_{305} = \frac{1.1518}{4.69} = 0.246$$

- error estimado de la diferencia entre ambos grupos combinados

$$s\bar{X}_{305} * s\bar{X}_{306} = \sqrt{s\bar{X}_{305}^2 + s\bar{X}_{306}^2}$$

$$s\bar{X}_{305} * s\bar{X}_{306} = \sqrt{0.311^2 + 0.246^2}$$

$$s\bar{X}_{305} * s\bar{X}_{306} = \sqrt{0.157}$$

$$S\bar{X}_{305} * S\bar{X}_{306} = 0.394$$

## **ANEXO N° 8**

**Procedimiento de análisis fisicoquímicos realizados a la leche  
fermentada con gránulos de kéfir.**



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

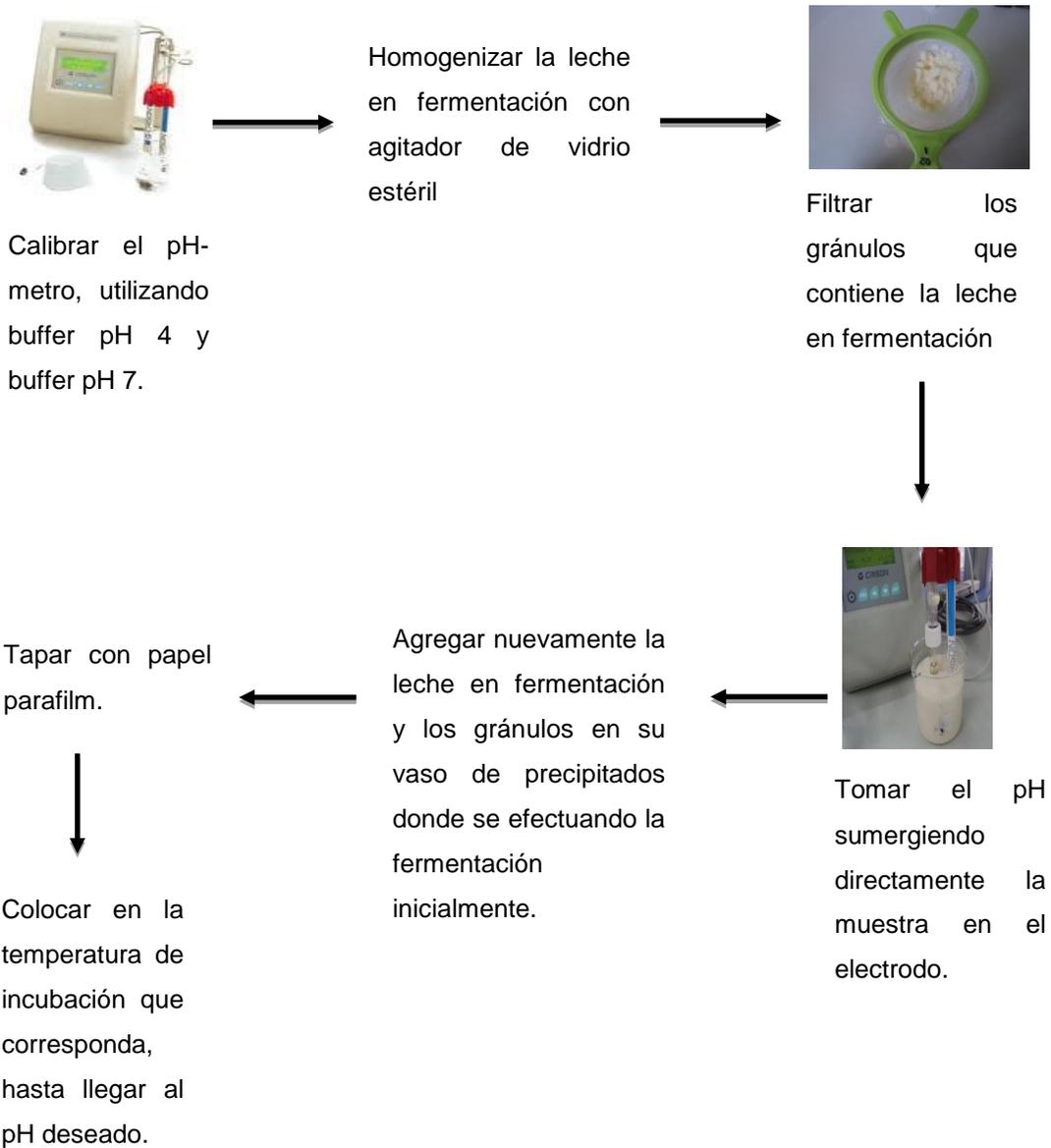


Colocar los gránulos en porta muestra estéril. Lavar y

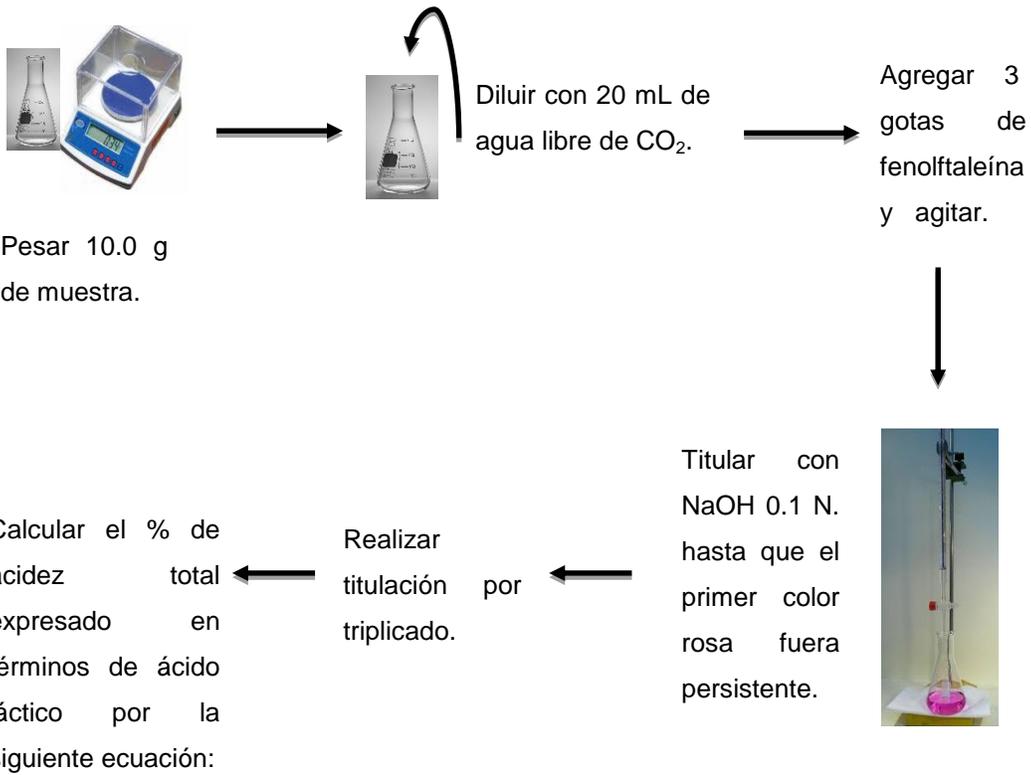


Pesar en balanza semi-analítica.

**Figura N°23: Procedimiento para la determinación de la biomasa** (22).

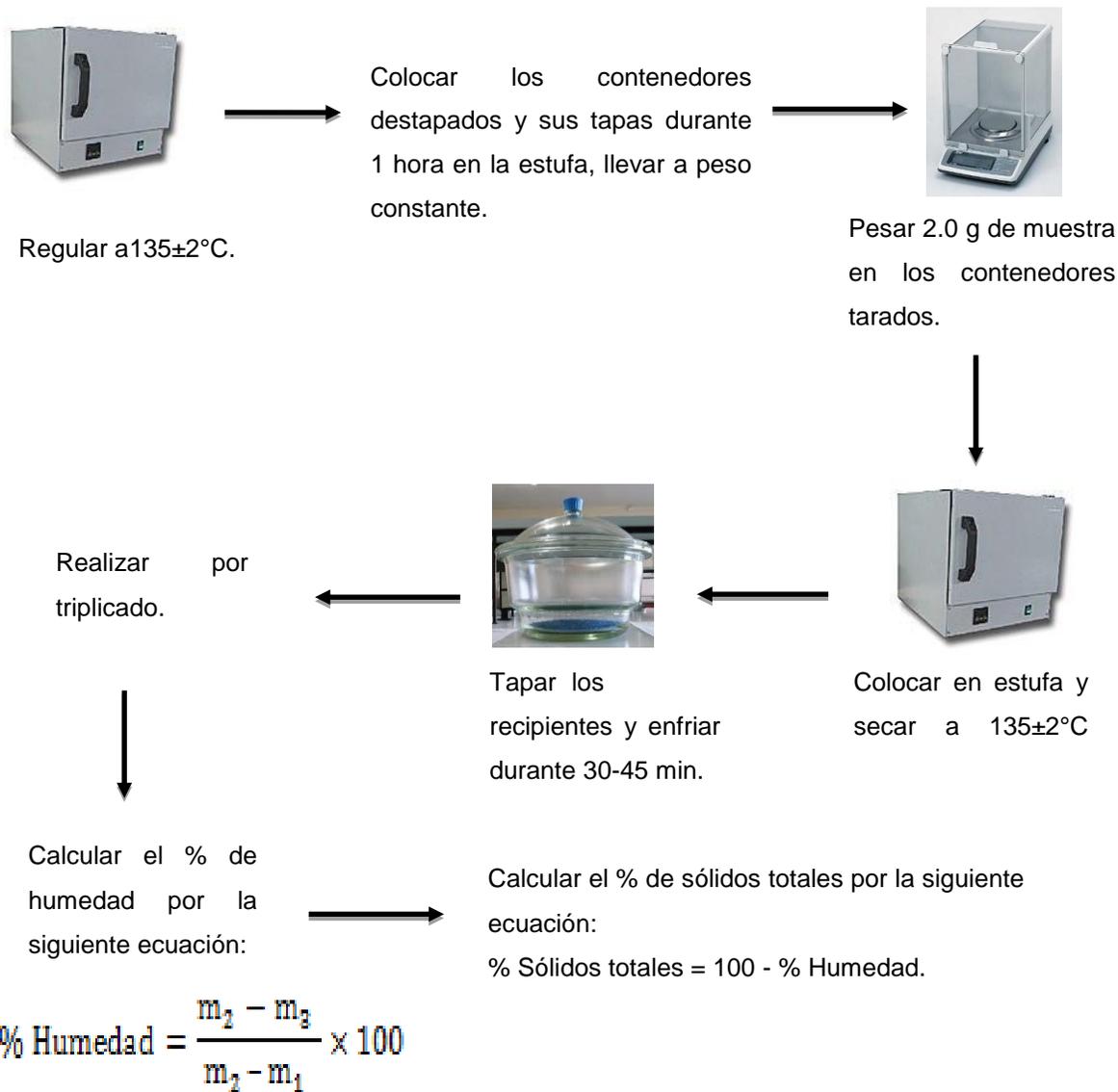


**Figura N°24: Procedimiento para la medición de pH** <sup>(25)</sup>.

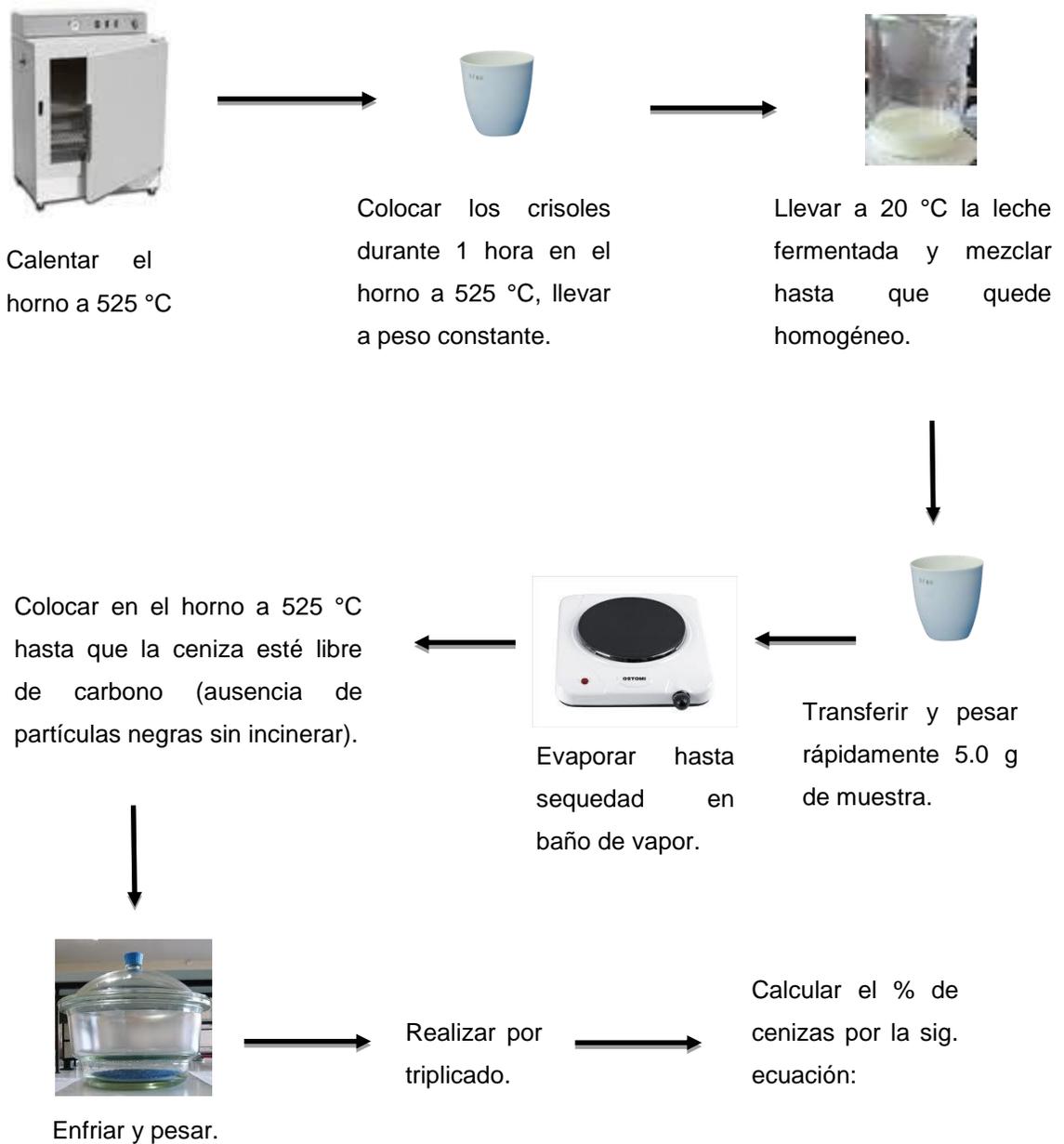


$$\% \text{ Acidez total} = \frac{\text{mL NaOH} \times N \times 0.09}{\text{g de muestra}} \times 100$$

**Figura N°25: Procedimiento para la determinación de acidez tituable** <sup>(25)</sup>.

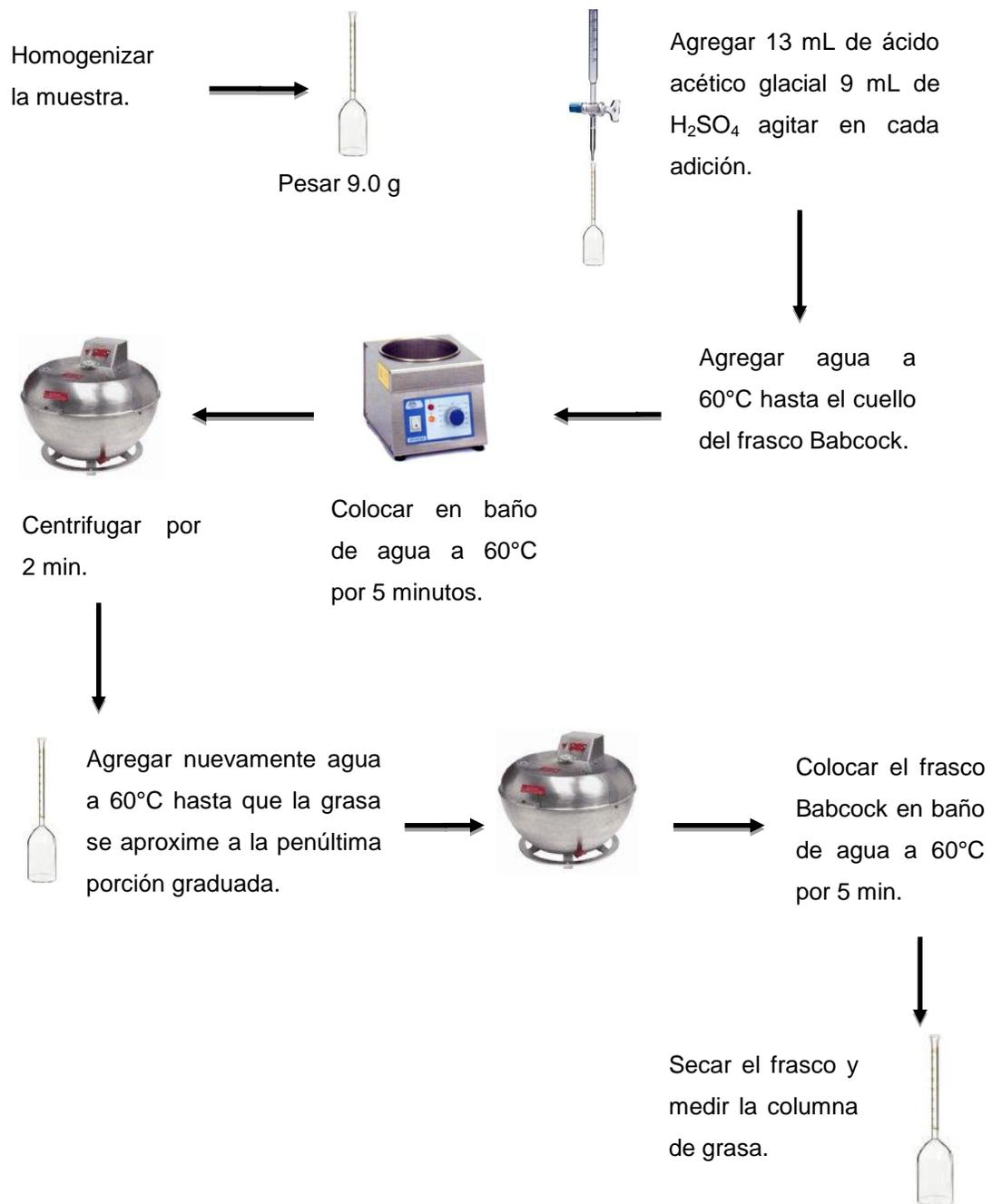


**Figura N°26: Procedimiento para la determinación de la humedad y sólidos totales** <sup>(25)</sup>.

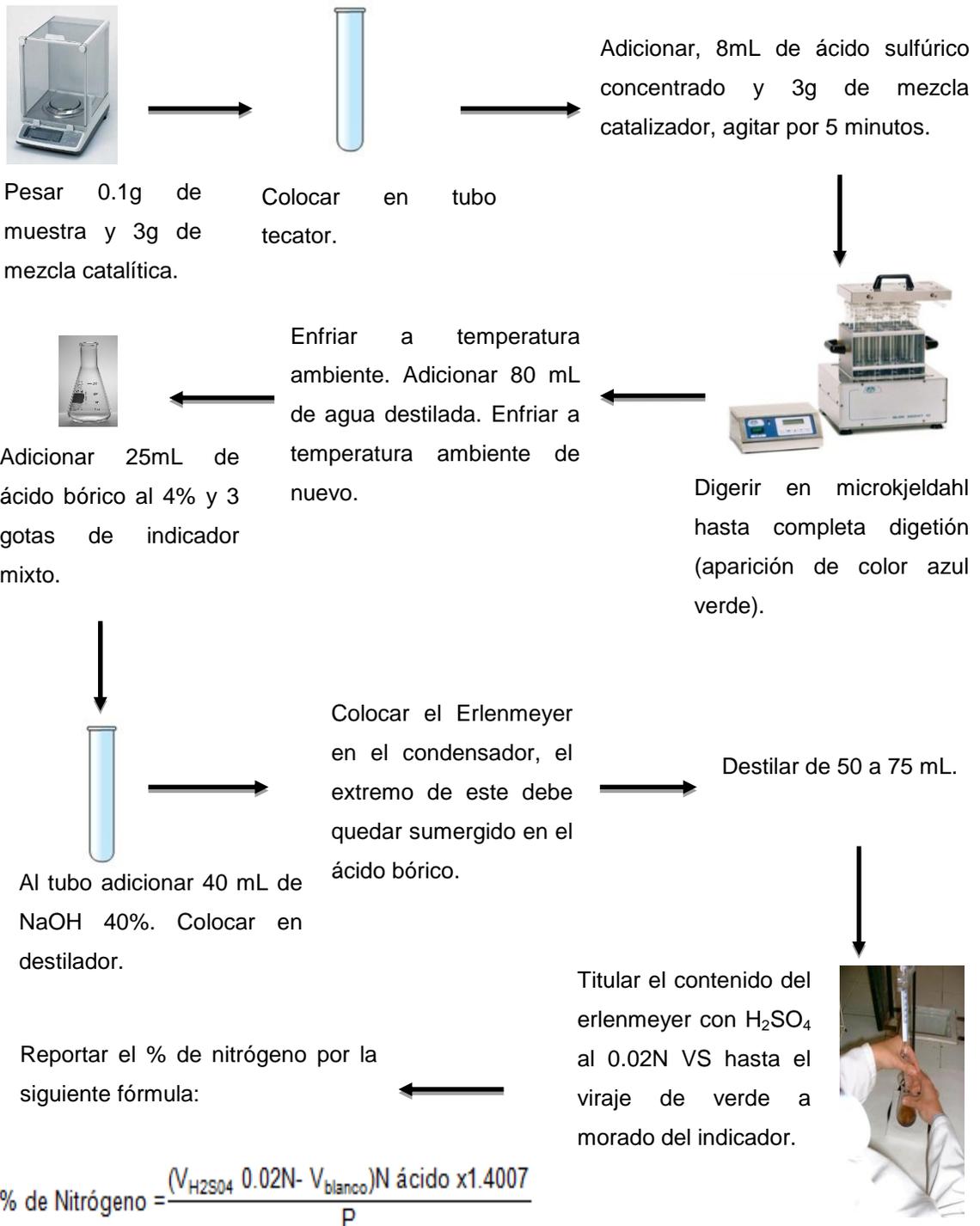


$$\% \text{ Cenizas} = \frac{M - m}{P} \times 100$$

**Figura N°27: Procedimiento para la determinación de cenizas** <sup>(25)</sup>.



**Figura N°28: Procedimiento para la determinación de grasas** <sup>(25)</sup>.



**Figura N°29: Procedimiento para la determinación de nitrógeno y proteínas** <sup>(25)</sup>.

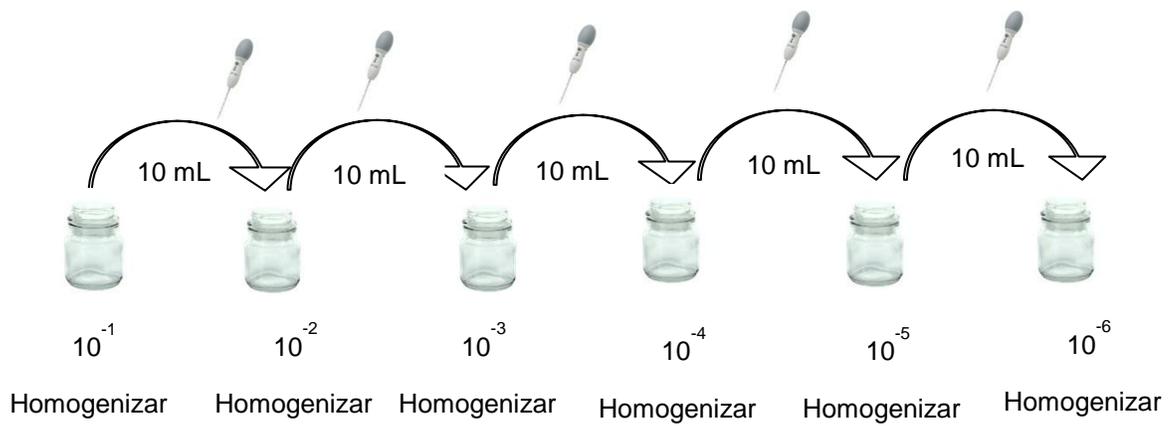
## **ANEXO N° 9**

**Procedimientos de análisis microbiológicos de leche descremada UHT y leche fermentada con gránulos de kéfir: aerobios mesófilos, coliformes totales, bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras.**

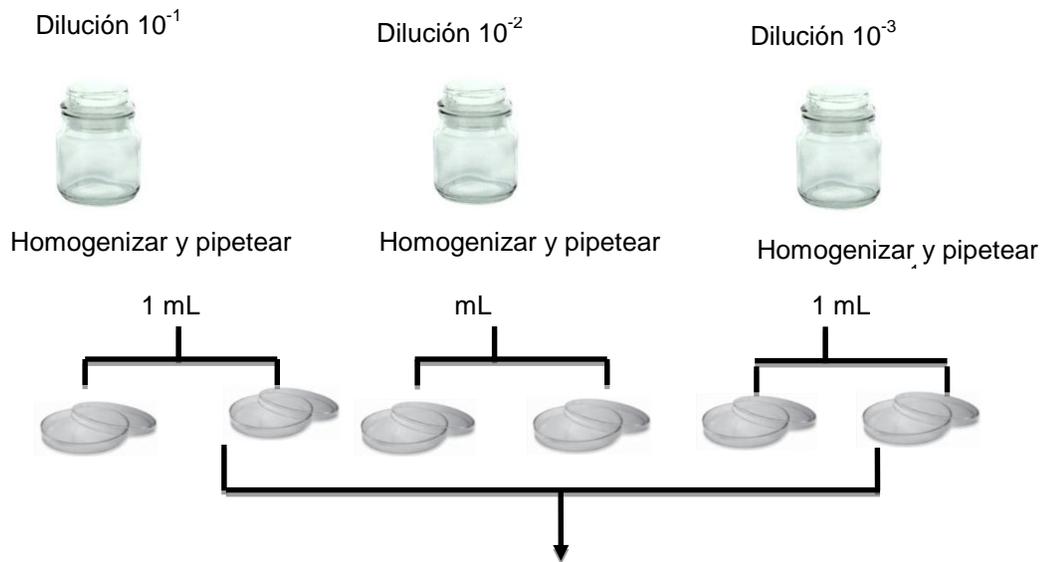
Pesar asépticamente 10 g de muestra, transferir a un frasco con 90 mL de agua peptonada buferada estéril.



Homogenizar por 30 segundos manualmente, agitando 25 veces el frasco. Esta es la dilución  $10^{-1}$ .



**Figura N°30: Procedimiento para la preparación de la muestra <sup>(13)</sup>.**

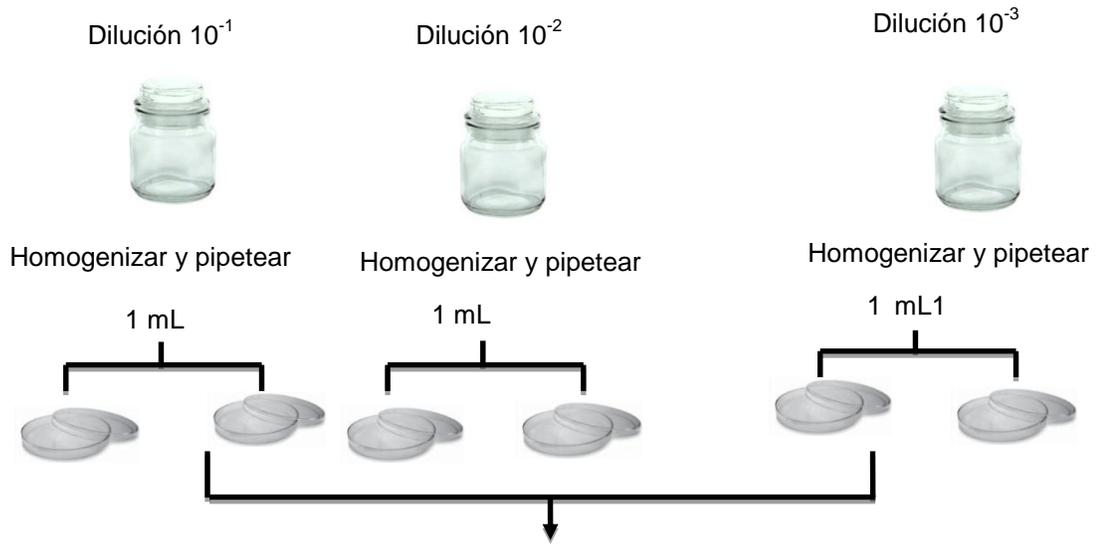


Adicionar a cada una de las placas 20 mL de agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico (pH 3.5) llevado y fundido a una temperatura de 45 °C, mezclar, y dejar solidificar.

Invertir las placas e incubar a temperatura ambiente durante 5-7 días. Contar las colonias.



**Figura N°31: Procedimiento para la determinación de hongos y levaduras** <sup>(13)</sup>.



Adicionar a cada una de las placas 20 mL de agar VRBA (agar bilis y rojo violeta) llevado a una temperatura de 45 °C, mezclar, y dejar solidificar.



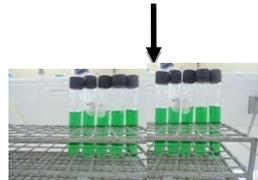
Invertir las placas e incubarlas a una temperatura de 35 ° C durante 18-24 horas. Contar las colonias rojo-púrpura rodeadas de zona de precipitación de los ácidos biliares con ayuda de un cuenta colonias.



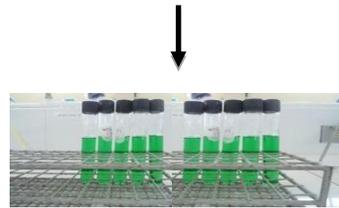
**Figura N°32: Procedimiento para la determinación de coliformes totales** <sup>(13)</sup>



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

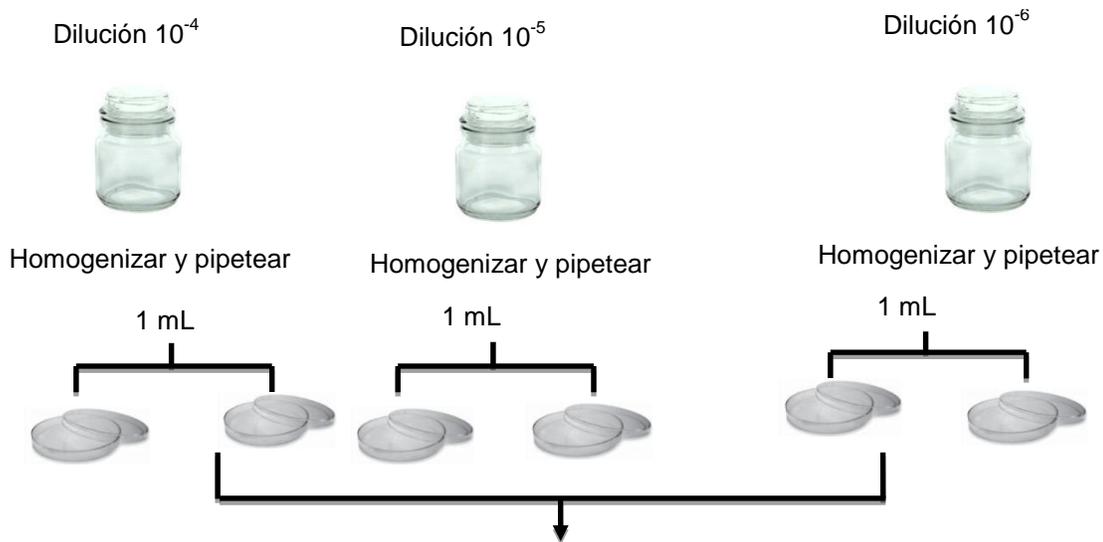


Incubar los tubos a 35 °C. Examinar a las 24 y a las 48 horas para la producción de gas.



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

**Figura N°33: Procedimiento para la prueba confirmatoria de coliformes totales** <sup>(13)</sup>.



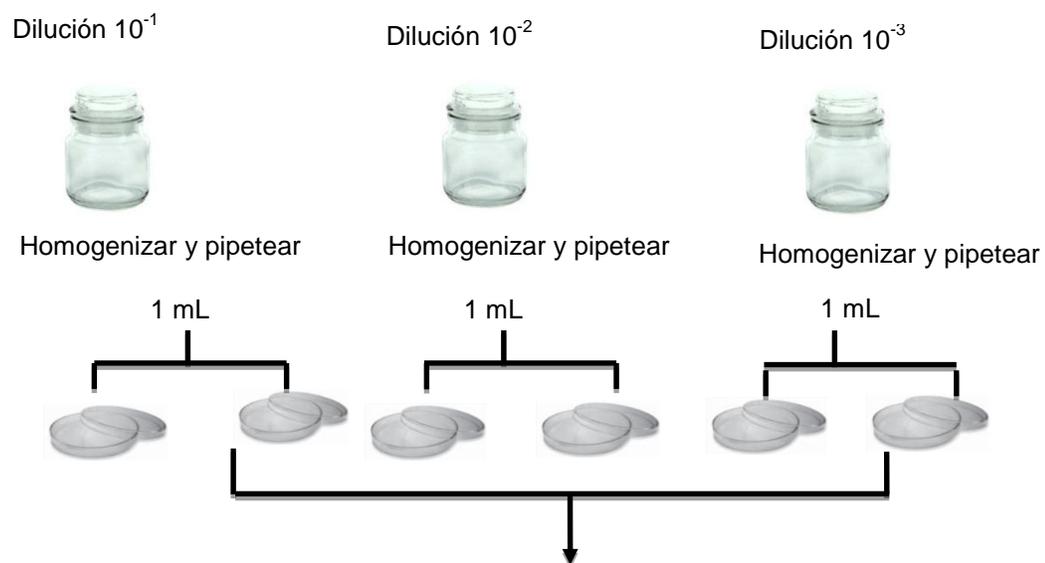
Adicionar a cada una de las placas 20 mL de agar Lactobacillus MRS, fundido y llevado a una temperatura de 45 °C, mezclar por rotación, y dejar solidificar.



Invertir las placas e incubar a una temperatura de 35 ° C durante 48 horas en condición anaerobia. Observar el crecimiento de colonias pequeñas color blanco-grisáceo, lisas o rugosas.



**Figura N°34: Procedimiento para la determinación de bacterias ácido lácticas** <sup>(13)</sup>.



Adicionar a cada una de las placas 20 mL de agar plate count llevado y fundido a una temperatura de 45 °C, mezclar, y dejar solidificar.



Invertir las placas e incubar a una temperatura 35°C por diez días. Contar las colonias.

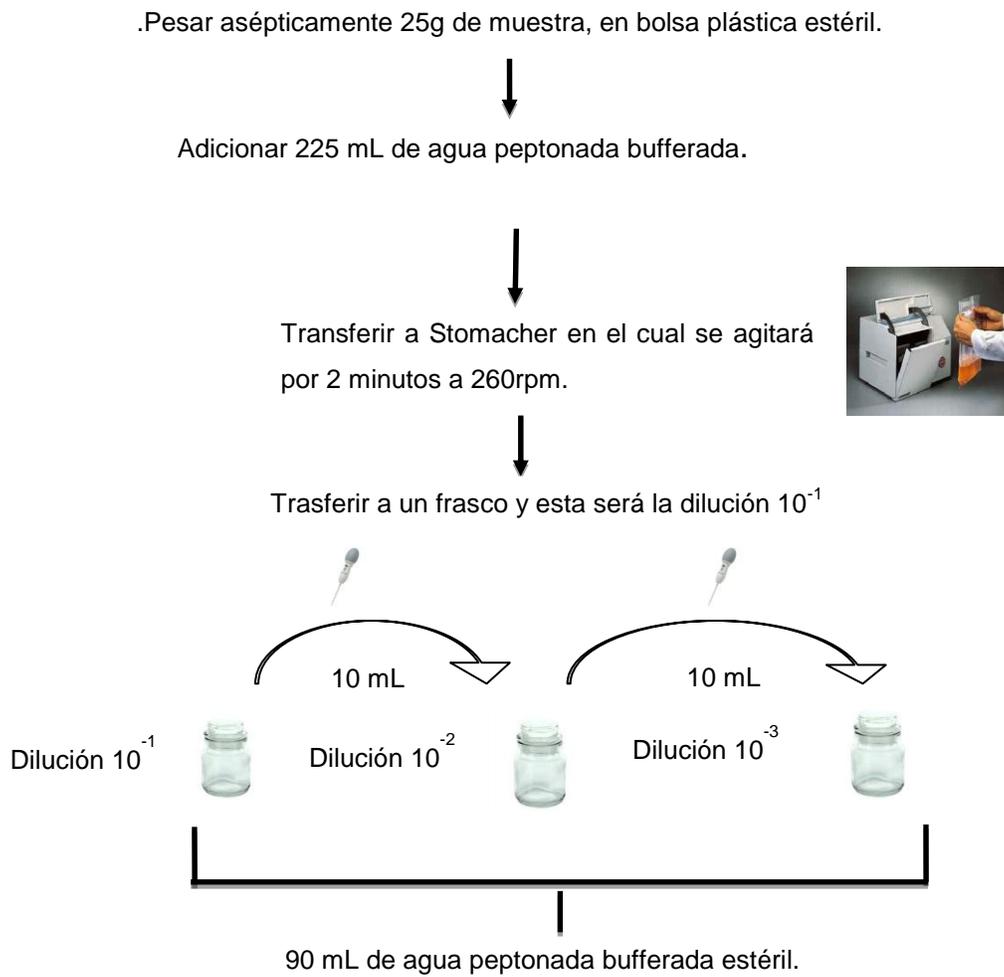


**Figura N°35: Procedimiento para la determinación de aerobios mesófilos** <sub>(13)</sub>.

**ANEXO N° 10**

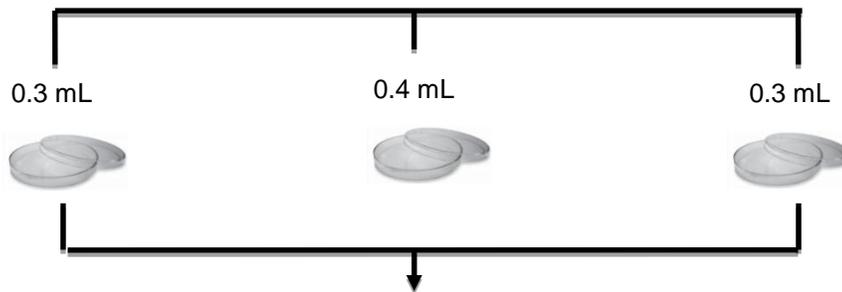
**Procedimientos microbiológicos para el saborizante de fresa:**

***Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.***



**Figura N°36: Procedimiento para la preparación de la muestra de *Staphylococcus aureus* <sup>(13)</sup>.**

Dilución  $10^{-1}$



Distribuir sobre la superficie del agar Bair-Parker usando una barrilla en "L".



Invertir placas (hasta que se absorba el inóculo en el medio de cultivo). Incubar una temperatura de  $35 \pm 1$  °C por 48 horas.



Contar colonias circulares, lisas, convexas, húmedas de 2 a 3mm. De diámetro, color gris o negro azabache, con margen de luz blanquecino.

**Figura N°37: Procedimiento para determinación de *Staphylococcus aureus* <sup>(13)</sup>.**

Pesar asépticamente 25g de muestra, en bolsa plástica estéril.



Adicionar 225 mL de Caldo Lactosado.



Transferir a Stomacher a, en el cual se agitará por 2 minutos a 260rpm.



Trasferir a un frasco y esta será la dilución  $10^{-1}$



Incubar la dilución  $10^{-1}$  por 24 horas a 35°C.



**Figura N°38: Procedimiento para la preparación de la muestra de *Salmonella spp* <sup>(13)</sup>.**



**ANEXO N° 11**  
**Normativas**

**Tabla N°35:** Requisitos para la Norma del Codex para leches fermentadas, CODEX STAN 243-2003.

<b>Requisito químico</b>	<b>kéfir</b>
Proteína láctea <sup>(a) (b)</sup> (%m/m)	Min. 2.7%
Grasa %m/m.	<10
Acidez valorable expresada como % de ácido láctico (m/m)	Min. 0.60%
Sólidos totales	-----
Suma de microorganismos <sup>(c)</sup> (ufc/g)	min. 10 <sup>7</sup>
Levaduras (ufc/g)	Min 10 <sup>4</sup>

- a) El contenido de proteína es 6,38 multiplicado por el nitrógeno Kjeldahl total terminado.
- b) La determinación de proteínas se verifica en el producto terminado periódicamente.
- c) Cultivo preparado a partir de gránulos de Kefir, *Lactobacillus Kefiri*, especie del género *Leuconostoc*, *Lactococcus*, y *Acetobacter* que crece en una estrecha relación específica.

**Tabla N°36:** Requisitos Sensoriales según la Especificación Técnica Cubana  
NC-TS457:2007

Aspecto	Color uniforme. Blanco si es natural. En leche fermentada aromatizada el color será típico al sabor que representa. Homogéneo.
Olor	Típico a producto lácteo fermentado. En la leche aromatizada, típico al aromatizante natural o artificial utilizado y a producto lácteo fermentado.
Sabor	Típico a producto lácteo fermentado. En la leche fermentada aromatizada, típico al aromatizante natural o artificial utilizado y al 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.

**Tabla N°37:** Requisitos Microbiológicos según la Especificación Técnica  
Cubana NC-TS457:2007 Leches fermentadas Especificaciones.

Requisitos microbiológicos	Leche fermentada con gránulos de kéfir
Recuento de Coliformes totales	Max $\leq 100$ UFC/g
Recuento de Hongos	Max $\leq 100$ UFC/g
Recuento de levaduras	Min $10^4$

**Tabla N°38:** Criterios microbiológicos del Reglamento Técnico Centro Americano RTCA 67.04.50:08.

1.0 Grupo de alimento: leche y productos lácteos.

1.2. Subgrupo del alimento: Leche UAT (UHT) en empaque aséptico.

16. Grupo de alimentos: caldos, sopas, salsas y puré de papa deshidratadas instantáneas.

16.3. Subgrupo del alimento: mezclas en seco instantáneas para refrescos y postres (flanes, pudines y gelatinas) y postres preparados.

parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite máximo permitido
Recuento de aerobios mesófilos (previa incubación a 35°C por 10 días)	10	A	<10UFC

**Tabla N°39:** Criterios microbiológicos para mezcla en seco.

Parámetro	categoría	Tipo de riesgo	Límite máximo permitido
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	C	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella spp/25g</i>	10		Ausencia

**Tabla N°40:** Composición de alimentos para Centroamérica del  
INCAP.

Código	Nombre	Agua %	Energía Kcal.	<b>Proteína</b> <b>g</b>	Grasa g	Carbohidrato g
1046	<b>Leche de vaca descremada fluida.</b>	89.92	42	<b>3.37</b>	0.97	4.99

Composición de alimento en 100g de porción comestible.

## **ANEXO N° 12**

**Esquema de saborización a la leche fermentada.**

## Anexo N° 12: Esquema de Saborización a La leche fermentada.



Fermentar 2000 mL leche descremada UHT con gránulos de kéfir a una temperatura de 20°C



Dividir la leche en dos porciones iguales: Saborizar una porción y la otra dejar sin Saborizar (a esta porción, tapar con papel parafilm dejar en refrigeración 4°C).



La porción a Saborizar realizar lo siguiente:



Pesar y agregar 5 g de sabor a fresa en polvo.



Colocar en hot plate completamente frio y mezclar con ayuda de un agitador magnético estéril a 250 rpm por 5 minutos



Pesar 3.12g de stevia en polvo e incorporar a la leche fermentada, mezclar por 5 minutos a 250 rpm



Tapar con papel parafilm, y colocar en refrigeración a una temperatura de 4°C.

**Figura N°40: Esquema de saborización de leche fermentada con gránulos de kéfir.**

**ANEXO N° 13**

**Hoja Técnica de sabor a fresa en polvo de Droguería Hermel.**

**Anexo N° 13: Hoja Técnica de sabor a fresa en polvo de Droguería Hermel.**



**HOJA TÉCNICA**  
DROGUERÍA HERMEL, S.A. DE C.V.

CÓDIGO: DH-ECC-309  
EDICIÓN: 01  
REVISIÓN: 06  
FECHA: 31/01/2014

**Nombre del Producto: Sabor Fresa en Polvo.**  
**Código: P1022**

**Descripción:** Saborizante en polvo para productos como Bebidas en polvo, alimentos en polvo y dulces.

**Modo de uso:**

Refrescos en polvo: Mezcle con los demás ingredientes en cualquier fase de la preparación.

Panadería y repostería: Agregue y mezcle junto con el azúcar.

Productos farmacéuticos en polvo: Mezcle con los demás ingredientes en cualquier fase de la preparación.

Gelatinas: Mezcle con los demás ingredientes en cualquier fase de la preparación.

**Dosis sugerida:** 0.25 -0.5 %

Atol líquido : 1.7 g/ 550 ml

Atoles en polvo: 2 -2.5 % p/p

**Ingredientes:** sabor artificial de fresa, Antihumectantes y excipientes. Todos los ingredientes están conforme a regulaciones del FDA y están listados en el actual FEMA/GRASS LIST.

<b>Parámetros</b>	<b>Especificación</b>
Apariencia	Polvo fino o granular

**Almacenamiento:** Mantengase en un lugar fresco y seco, en el contenedor bien cerrado y protegido de la Humedad y la luz solar.

Aditivo Alimentario. Todos los componentes están incluidos en las listas GRAS, elaboradas por la asociación de fabricantes de sabores y extractos de los Estados Unidos (FEMA: Flavors and Extracts manufacturers Association), y los aditivos están aprobados por el Codex Alimentarius.

Droguería Hermel, S.A. de C.V.  
CONTROL DE CALIDAD

**Figura N°41: Hoja Técnica de sabor a fresa en polvo de Droguería Hermel.**

**ANEXO N° 14**

**Certificado de análisis de sabor a fresa en polvo de Droguería  
Hermel.**

**Anexo N° 14: Certificado de análisis de sabor a fresa en polvo de  
Droguería Hermel.**



**DROGUERÍA HERMEL S.A. DE C.V.**

Calle Sierra Madre No 20, Residencial Montebello, San Salvador  
Tel.: (503) 2218-0800 Fax.: (503) 2218-0899

**Certificado de Análisis**

<b>Nombre del Producto:</b>	SABOR FRESA EN POLVO		
<b>Código:</b>	P1022-B	<b>No de Lote:</b>	32296
<b>Fabricado:</b>	07/2014	<b>Vence:</b>	07/2015

<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>
Apariencia:	Polvo
Color:	Rosado tenue
Olor:	A Fresa
Concentración Vrs Patrón	Conforme a estándar
Solubilidad:	Soluble en agua

**Almacenamiento:** Mantengase en un lugar fresco y seco, en el contenedor bien cerrado y protegido de la Humedad y la luz solar.

Aditivo Alimentario. Todos los componentes están incluidos en las listas GRAS, elaboradas por la asociación de fabricantes de sabores y extractos de los Estados Unidos (FEMA: Flavors and Extracts manufacturers Association), y los aditivos están aprobados por el Codex Alimentarius.

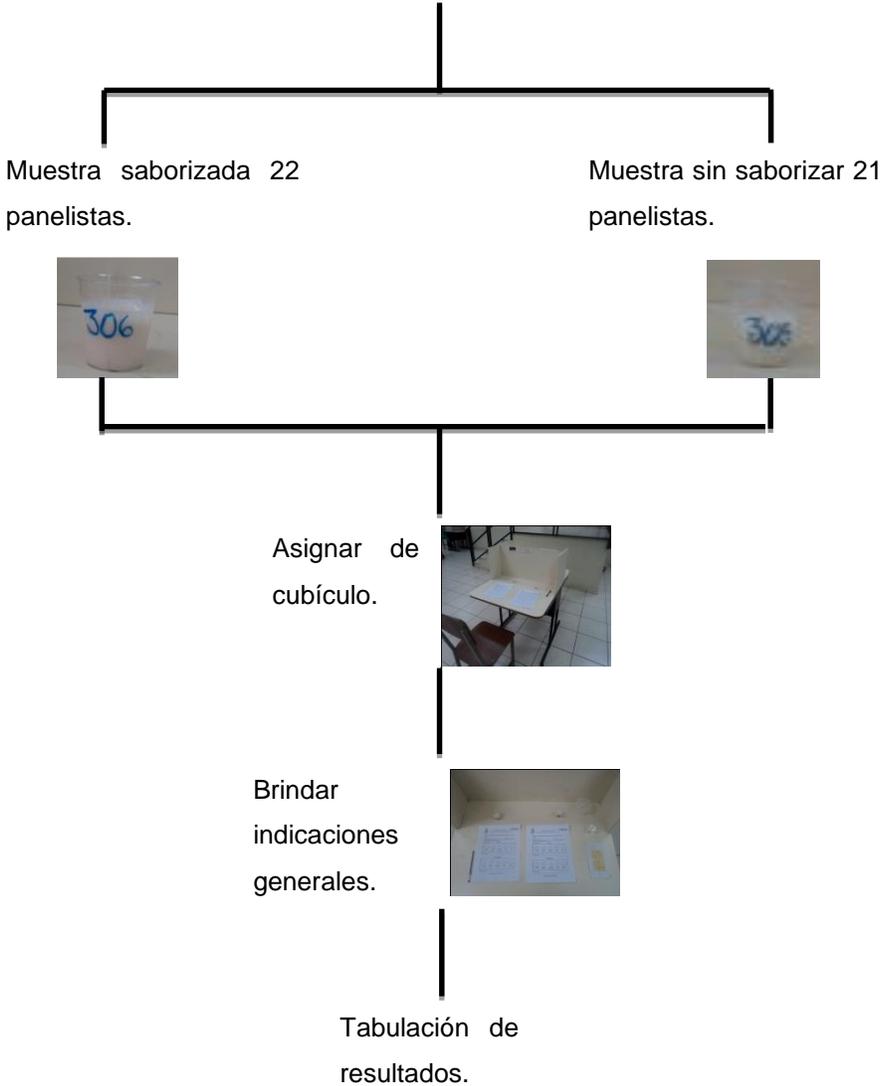
Droguería Hermel, S.A. de C.V.  
CONTROL DE CALIDAD

**Figura N°42: Certificado de análisis de sabor a fresa en polvo de  
Droguería Hermel.**

**ANEXO N° 15**  
**Esquema prueba de aceptabilidad.**

**Anexo N°15: Esquema prueba hedónica de aceptabilidad.**

Elegir panelistas de forma aleatoria entre 17 y 65 años.



**Figura N° 43: Esquema prueba hedónica de aceptabilidad** <sup>(31)</sup>.

**ANEXO N°16**  
**Hoja de evaluación hedónica.**



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**  
**CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN SALUD**  
**BIOTECNOLOGIA**

Evaluación hedónica del sabor y consistencia de leche fermentada con gránulos de kéfir.

EDAD: \_\_\_\_\_

SEXO: \_\_\_\_\_

INDICACIONES: marque con una "X" la cara que mejor represente para usted el grado de gusto o disgusto del producto.

MUESTRA: 305

SABOR

				
Me disgusta Mucho	me disgusta un poco	no me gusta ni me disgusta	me gusta poco	me gusta mucho

Sugerencias: \_\_\_\_\_

CONSISTENCIA

				
Me disgusta Mucho	me disgusta un poco	no me gusta ni me disgusta	me gusta poco	me gusta mucho

Sugerencias: \_\_\_\_\_

¡GRACIAS POR PARTICIPAR!



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**  
**CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN SALUD**  
**BIOTECNOLOGIA**

Evaluación hedónica del sabor y consistencia de leche fermentada con gránulos de kéfir.

EDAD: \_\_\_\_\_

SEXO: \_\_\_\_\_

INDICACIONES: marque con una "X" la cara que mejor represente para usted el grado de gusto o disgusto del producto

MUESTRA: 306

SABOR

				
Me disgusta Mucho	me disgusta un poco	no me gusta ni me disgusta	me gusta poco	me gusta mucho

Sugerencias: \_\_\_\_\_

CONSISTENCIA

				
Me disgusta Mucho	me disgusta un poco	no me gusta ni me disgusta	me gusta poco	me gusta mucho

Sugerencias: \_\_\_\_\_

¡GRACIAS POR PARTICIPAR

**ANEXO N° 17**  
**Tabla t-Student.**

**Tabla N° 41: Distribución de t.**

<b>TABLA A-3</b>		Distribución t: Valores críticos t				
		Área en una cola				
		0.005	0.01	0.025	0.05	0.10
Grados de libertad	Área en dos colas					
	0.01	0.02	0.05	0.10	0.20	
1	63.657	31.821	12.706	6.314	3.078	
2	9.925	6.965	4.303	2.920	1.886	
3	5.841	4.541	3.182	2.353	1.638	
4	4.604	3.747	2.776	2.132	1.533	
5	4.032	3.365	2.571	2.015	1.476	
6	3.707	3.143	2.447	1.943	1.440	
7	3.499	2.998	2.365	1.895	1.415	
8	3.355	2.896	2.306	1.860	1.397	
9	3.250	2.821	2.262	1.833	1.383	
10	3.169	2.764	2.228	1.812	1.372	
11	3.106	2.718	2.201	1.796	1.363	
12	3.055	2.681	2.179	1.782	1.356	
13	3.012	2.650	2.160	1.771	1.350	
14	2.977	2.624	2.145	1.761	1.345	
15	2.947	2.602	2.131	1.753	1.341	
16	2.921	2.583	2.120	1.746	1.337	
17	2.898	2.567	2.110	1.740	1.333	
18	2.878	2.552	2.101	1.734	1.330	
19	2.861	2.539	2.093	1.729	1.328	
20	2.845	2.528	2.086	1.725	1.325	
21	2.831	2.518	2.080	1.721	1.323	
22	2.819	2.508	2.074	1.717	1.321	
23	2.807	2.500	2.069	1.714	1.319	
24	2.797	2.492	2.064	1.711	1.318	
25	2.787	2.485	2.060	1.708	1.316	
26	2.779	2.479	2.056	1.706	1.315	
27	2.771	2.473	2.052	1.703	1.314	
28	2.763	2.467	2.048	1.701	1.313	

**Tabla N° 41: Continuación**

<b>TABLA A-3</b>		<b>Distribución <i>t</i>: Valores críticos <i>t</i></b>				
		<b>Área en una cola</b>				
		<b>0.005</b>	<b>0.01</b>	<b>0.025</b>	<b>0.05</b>	<b>0.10</b>
<b>Grados de libertad</b>	<b>Área en dos colas</b>					
	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>	<b>0.05</b>	<b>0.10</b>	<b>0.20</b>	
29	<b>2.756</b>	2.462	<b>2.045</b>	1.699	1.311	
30	<b>2.750</b>	2.457	<b>2.042</b>	1.697	1.310	
31	<b>2.744</b>	2.453	<b>2.040</b>	1.696	1.309	
32	<b>2.738</b>	2.449	<b>2.037</b>	1.694	1.309	
34	<b>2.728</b>	2.441	<b>2.032</b>	1.691	1.307	
36	<b>2.719</b>	2.434	<b>2.028</b>	1.688	1.306	
38	<b>2.712</b>	2.429	<b>2.024</b>	1.686	1.304	
40	<b>2.704</b>	2.423	<b>2.021</b>	1.684	1.303	
45	<b>2.690</b>	2.412	<b>2.014</b>	1.679	1.301	
50	<b>2.678</b>	2.403	<b>2.009</b>	1.676	1.299	
55	<b>2.668</b>	2.396	<b>2.004</b>	1.673	1.297	
60	<b>2.660</b>	2.390	<b>2.000</b>	1.671	1.296	
65	<b>2.654</b>	2.385	<b>1.997</b>	1.669	1.295	
70	<b>2.648</b>	2.381	<b>1.994</b>	1.667	1.294	
75	<b>2.643</b>	2.377	<b>1.992</b>	1.665	1.293	
80	<b>2.639</b>	2.374	<b>1.990</b>	1.664	1.292	
90	<b>2.632</b>	2.368	<b>1.987</b>	1.662	1.291	
100	<b>2.626</b>	2.364	<b>1.984</b>	1.660	1.290	
200	<b>2.601</b>	2.345	<b>1.972</b>	1.653	1.286	
300	<b>2.592</b>	2.339	<b>1.968</b>	1.650	1.284	
400	<b>2.588</b>	2.336	<b>1.966</b>	1.649	1.284	
500	<b>2.586</b>	2.334	<b>1.965</b>	1.648	1.283	
750	<b>2.582</b>	2.331	<b>1.963</b>	1.647	1.283	
1000	<b>2.581</b>	2.330	<b>1.962</b>	1.646	1.282	
2000	<b>2.578</b>	2.328	<b>1.961</b>	1.646	1.282	
Grande	<b>2.576</b>	2.326	<b>1.960</b>	1.645	1.282	

**ANEXO N° 18**  
**Cálculos de prueba hedónica.**

## Cálculos prueba hedónica

Obtención de grados de libertad

$$g.l = (N_{305} + N_{306}) - 2$$

$$g.l = (21 + 22) - 2$$

$$g.l = 41$$

- sabor

Fórmula para la prueba t

$$t = \frac{(\bar{X}_{305} - \bar{X}_{306})}{S\bar{X}_{305} * S\bar{X}_{306}}$$

$$t = \frac{(2.1428 - 3.2272)}{0.394}$$

$$t = \frac{(-1.0844)}{0.394} = -2.751$$

Consistencia

Fórmula para la prueba t

$$t = \frac{(\bar{X}_{305} - \bar{X}_{306})}{S\bar{X}_{305} * S\bar{X}_{306}}$$

$$t = \frac{(3.095 - 3.45)}{(0.334)}$$

$$t = -1.07$$