

## PRODUCCIÓN DE LECHE BULGARADA EN UN BIORREACTOR AEROBIO UTILIZANDO UN CULTIVO INMOVIL DE KEFIR

### PRODUCTION OF BULGARA MILK IN AN AEROBIO BIORREACTOR USING A KEFIR IMMOVABLE CROP

<sup>1\*</sup> Cejudo-Valentín, R.<sup>1</sup>, Bautista-García, L.<sup>1</sup>, Cortes-Pintado, A. E.<sup>1</sup>, Martínez-Gálvez, R. S.<sup>1</sup>, Salinas-Ramírez, M.<sup>1</sup>, Millán-Galindo, S. L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ingeniería en Procesos Bioalimentarios de la Universidad Tecnológica de Tehuacán. Prolongación de la 1 sur No. 1101, San Pablo Tepetzingo C.P. 75859, Tehuacán, Puebla, México. \*ramiro.cejudo@uttehuacan.edu.mx

#### Resumen

El kéfir es una conglomeración de bacterias ácido lácticas y levaduras (*Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*) con propiedades y beneficios a la salud, considerado como uno de los súper alimentos del futuro. El objetivo del presente proyecto fue desarrollar un biorreactor aerobio con cultivo inmovilizado para la elaboración de una bebida fermentada a base de leche, saborizada con chilacayote (*Cucúrbita ficifolia*). Se obtuvo una bebida fermentada de kéfir ligeramente carbonatada en leche entera pasteurizada, con un aumento de biomasa de 14%, alcanzando una concentración final de ácido láctico de 7 g/L, pH de  $4.5 \pm 0.05$  y una producción máxima de etanol de 0.78 g/L.

**Palabras clave:** Biorreactor, Kefir, aerobio, cultivo inmóvil.

#### Abstract

Kefir is a conglomeration of lactic acid and yeast bacteria (*Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Streptococcus*) with properties and health benefits, considered one of the superfoods of the future. The objective of this project was to develop an aerobic bioreactor with immobilized culture for the elaboration of a fermented milk-based beverage, flavored with chilacayote (*Cucúrbita ficifolia*). A slightly carbonated fermented kefir drink was obtained in pasteurized whole milk, with a biomass increase of 14%, reaching a final concentration of lactic acid of 7 g / L, pH of  $4.5 \pm 0.05$  and a maximum ethanol production of 0.78 g / L.

**Keywords:** Bioreactor, Kefir, aerobic, Still Cultivation.

---

1\* Autor responsable

Recibido: Mayo 2019. Aceptado: Agosto 2019

Publicado como ARTÍCULO en la Revista Tecnológica Agrobioalimentaria 3(1): 43-48, 2019, ISSN 2395-8332

## I. INTRODUCCIÓN

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

El kéfir es un producto lácteo fermentado, este surgió en las montañas de Caúcaso, su nombre deriva de la palabra “keyif” que en turco significa “sentirse bien”. Es un alimento que más allá del aporte nutricional de sus componentes, ha demostrado beneficiar una o más funciones fisiológicas del organismo, mejorando el estado de salud, y/o reducir el riesgo a padecer enfermedades (Diplock *et al.*, 1999).

Se sabe que el kéfir contiene tres familias de bacterias, los lactobacilos, los lactococos y los leuconostococos, con presencia ocasional de otra, las acetobacterias, pero resulta difícil estudiarlas separadamente porque aislarlas y cultivarlas por familias es casi imposible. Y es que los gránulos de kéfir forman un conjunto de bacterias y levaduras que actúan con un metabolismo combinado que resulta beneficioso para todos.

Los productos del desecho metabólico de las bacterias, por ejemplo, son utilizados como fuente energética por las levaduras y éstas, a su vez, proveen a las bacterias de sus necesidades de vitaminas, aminoácidos y factores de crecimiento. Siendo esa eficiente simbiosis lo que explica que las colonias que forman los gránulos e incluso el kéfir líquido se mantengan invariables a lo largo del año a pesar de la cambiante calidad de la leche sobre la que se desarrollan y de la presencia en ésta de antibióticos y otras sustancias inhibitorias

(Figuroa-Rodríguez *et al.*, 2017).

El término chilacayote (*Cucúrbita ficifolia*) proviene del náhuatl tzilacayotli, de tzilac, que significa liso, y ayotli, que significa calabaza, es decir, calabaza lisa. Fruto de la familia de las cucurbitáceas, y por ende similar a éstas. Mientras que algunos especialistas ubican su origen y domesticación en México, otros lo ubican en Sudamérica o en ambas regiones. (Lira Saade *et al.*, 2009).

Al realizar una identificación física y química completa del fruto de chilacayote para su posterior uso en el desarrollo de alimentos, se evaluaron sus características físicas y se determinó su distribución en pulpa, semilla y cáscara, obteniéndose como promedio, 69 %, 3.5 % y 27.5 % respectivamente. Por lo tanto se obtuvo la caracterización detallada de la composición del chilacayote (Lira Saade *et al.*, 2009).

Tabla 1. Composición química del chilacayote.

Componentes	Cantidad (% ,g,mg)
Agua	92.7%
Proteína	0.8 g
Grasa	0.10 g
Carbohidratos	6.0 g
Fibra total	Nd
Ceniza	0.40 g
Calcio	12.0 mg
Fosforo	41.0 mg
Hierro	0.20 mg
Tiamina	0.06 mg
Riboflamina	0.04 mg
Vitamina C	46.0 mg

Fuente: Gómez *et al.* ( 2005).

Con la finalidad de aprovechar el fruto y dichas propiedades antes mencionadas, se optó por

darle un mejor enfoque para ayudar a la región. Por ello se pretende realizar un yogur tipo Kéfir a base de chilacayote, la cual represente una alternativa para incrementar el consumo de productos prebióticos en el mercado.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Diseño experimental de la Fermentación*

Para el desarrollo de la fermentación se utilizó el Biorreactor aerobio con cultivo inmóvil (Figura 1), conteniendo un medio de leche pasteurizada entera estandarizada a 13 °Brix, con una agitación manual cada 4 horas y suministrando oxígeno durante el minuto posterior, la fermentación se llevó a cabo durante 32 horas con 10g de inóculo por litro, tomando alícuotas del medio cada 4 horas, para ser analizada y al cabo de las 32 horas de fermentación, se cambió el medio de cultivo por uno nuevo y se reinició el proceso por 32 horas más.



Figura 1. Biorreactor aerobio usado en la elaboración

de Kefir.

### *Análisis físicoquímicos de las muestras durante la fermentación*

#### *Determinación de biomasa*

Se realizó de acuerdo al método descrito por Sánchez y Martínez 2012, la muestra se filtró y se pesó en base húmeda utilizando una balanza analítica OHAUS modelo PA214 y un vidrio de reloj de la marca Kimax®

#### *Determinación de pH*

Se determinó de acuerdo a la NMX-F-317-S-1978, Se realizó directamente del fermentado, utilizando un potenciómetro HANNA modelo pH 211R, con un electrodo HANNA insstruments®.

#### *Determinación de acidez titulable*

Se tomaron 5 mL de leche bulgarada en un matraz Erlenmeyer marca Kimax® de 250 mL, se adicionaron 20 mL de agua destilada, se adicionaron 2 gotas de fenolftaleína como indicador. La titulación se realizó con NaOH 0.1 N y se registró el volumen gastado del NaOH por muestra. La acidez titulable se expresó en g de ácido láctico por litro, utilizando con referencia la NMX-F-420-1982.

#### *Determinación de sólidos solubles (°Brix)*

Se realizó de acuerdo a la NMX-F-436-SCFI-2011 utilizando un refractómetro ATAGO modelo Master (ATC), y se basa en obtener el índice de refracción de soluciones que contengan principalmente sacarosa.

### *Cuantificación de producción de etanol por el método colorimétrico del dicromato de potasio*

#### *Preparación de soluciones*

De acuerdo con lo descrito por Oviedo *et al.*, (2009), se preparó una solución oxidante la cual consistió en una mezcla formada por 4.165 g de dicromato de potasio y 250 mL de ácido sulfúrico y posteriormente se aforó con agua

destilada a 1 L (solución b), se preparó una solución saturada de carbonato de potasio (reactivo grado técnico, solución c). En tubos de ensayo se adicionaron 4 mL de la solución b y 2 mL de la solución c, esto gota a gota hasta que finalizó el burbugeo (solución d).

*Cuantificación de etanol*

En tubos de ensayo de 16 mL se agregaron 2 mL de la solución a (muestra clarificada) y 2 mL de la solución d, se calentaron en baño María a temperatura entre 80 y 90°C durante 20 min, después del tiempo transcurrido se enfriaron a chorro de agua fría. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific modelo Genesys 10S uv-vis) a 440 nm.

*Determinación de densidad*

Se realizó la determinación mediante el método descrito por Gonzales, 2012, utilizando una balanza analítica OHAUS modelo PA214 y una probeta marca Kimax® de una capacidad de 25 mL.

*Determinación de lactosa*

Se realizó la determinación de lactosa de acuerdo a la metodología descrita en Lopez-Legarda *et al.*, 2017, empleando un espectrofotómetro THERMO CIENTIFICO modelo G10S UV-Vis.

**III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*Producción de biomasa del kéfir*

Como se observa en la figura 2, la velocidad de crecimiento de los gránulos de kéfir fue del 14% y tienen una fase exponencial casi constante en el tiempo en que los microorganismos se alimentan de lactosa, en la fase estacionaria estos dejan de crecer por el agotamiento del sustrato, sin embargo, no se llega a la fase de muerte debido a que se reinicia el proceso al adicionar los gránulos en leche fresca.

Ramírez *et al* 2016, obtuvieron un crecimiento del 59.14% de gránulos de kéfir a la misma concentración (10 g/L), sin embargo, usaron

tiempos de fermentación diferentes y temperaturas controladas.

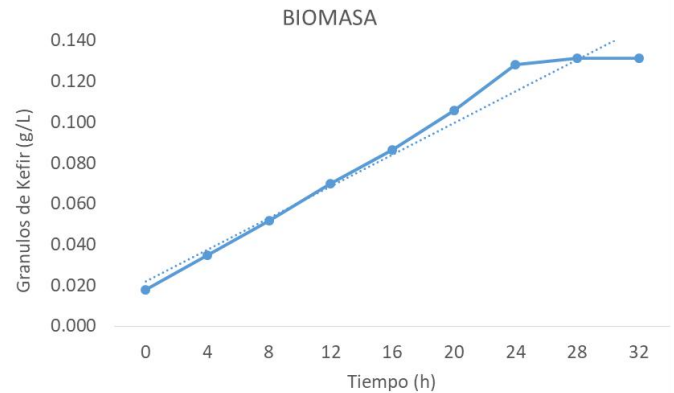


Figura 2. Velocidad de crecimiento de biomasa

*Ácido láctico y pH*

En la variación de pH y producción de ácido láctico se puede observar que el primero disminuye 2.2 unidades de pH, mientras el segundo aumenta 5 g/L como resultado del proceso de fermentación como se muestran en la figura 3. López-Rojo *et al.*, 2017, muestran una reducción de 1.55 unidades de pH, y un incremento de ácido láctico de 4.77 g/L, lo que corrobora el comportamiento de estas variables.

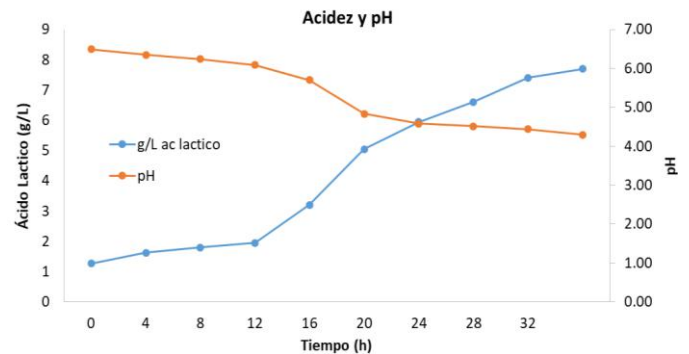


Figura 3. Valoración de pH y producción Ac. Láctico.

*Producción de etanol y consumo solidos solubles (°Brix)*

La producción de etanol fue de 0.78 g/L a las 32 h de fermentación, así mismo se observan la disminución del 46% de los sólidos solubles

(°Brix) durante la fermentación debido al consumo de los azúcares como sustrato de las levaduras (Rubio, 1993) cómo se muestra en la figura 4. López-Rojo *et al.* (2017), reportaron un contenido de etanol de 0.8 mg/ml, además de una reducción mínima de sólidos en °Brix, lo cual es mucho menor a nuestros resultados.

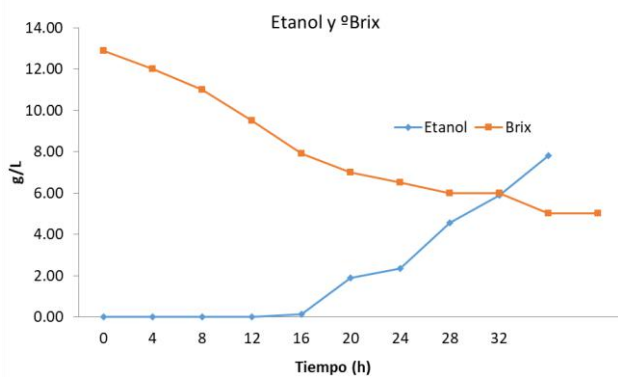


Figura 4. Producción de etanol y valoración de °Brix.

#### Determinación de densidad

En la figura 5, se observa el aumento de la densidad conforme al tiempo en un periodo de 32 h del proceso de fermentación, donde ambos parámetros son directamente proporcionales debido al aumento de biomasa (Kéfir).

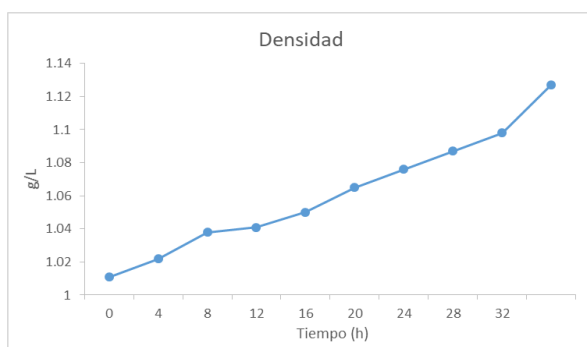


Figura 5. Determinación de densidad

#### Cuantificación de lactosa en el kéfir

Nevin *et al.* (1988), reportaron un contenido de lactosa del 4% en fermentos con Kéfir, sin embargo nuestros resultados revelaron un contenido menor de lactosa de 2.9%, lo cual indica que los gránulos de Kéfir en nuestras fermentaciones utilizaron una mayor cantidad de lactosa como sustrato (figura 6).

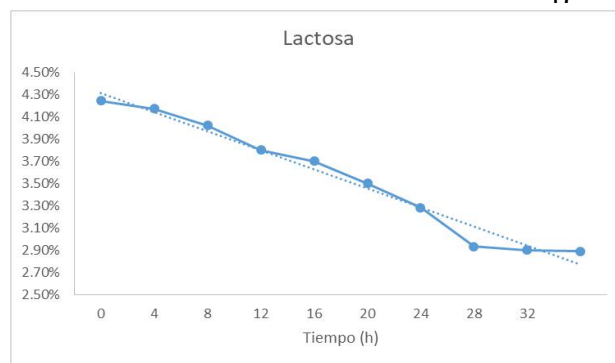


Figura 6. Cuantificación de lactosa.

## IV. CONCLUSIÓN

Se obtuvo una bebida fermentada de kéfir ligeramente carbonatada en leche entera pasteurizada, con un aumento de biomasa de 14%, alcanzando una concentración final de ácido láctico de 7 g/L, pH de  $4.5 \pm 0.05$  y una producción máxima de etanol de 0.78 g/L.

## V. REFERENCIAS

- Bai F.W., Anderson W. A., Young M. M., 2009. Ethanol fermentati on technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnology advances.
- Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid MB (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. Br. J. Nutr. 8: S1-S27.
- Gómez A, Divier A; Bedoya O, (2005), Composición nutricional de la leche de ganado vacuno Revista Lasallista de Investigación, vol. 2.
- Gonzales A. Control de calidad de leche, determinación de densidad, Tecnología de la leche, 2012.
- Lira Saade, R., Eguiarte Fruns, L., Montes Hernández, S., 2009. Recopilación y análisis de la información existente de las especies de los géneros Cucurbita y

- Sechium que crecen y/o se cultivan en México, Journal of Botany.
- Lopez-Legarda et all .Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales Vol. 29, no.2, mayo-agosto, 2017, págs. 180-198
- López-Rojo J, P; García-Pinilla S; Hernández-sanchez S; Cornejo-Mazón M (2017)9. Estudio de la fermentación de Kefir de agua de piña con tibicos. Revista Mexicana de ingeniería Química, Universidad Metropolitana vol. 16, pag 405-414.
- Nevin S; Scrimshaw F; Edwin B (1988). La aceptabilidad de la leche y los productos lácteos con una alta prevalencia de intolerancia a la lactosa", American Journal of Clinical Nutrition; vol. 48, pag 1080-1159.
- NMX-F-317-S-1978. DETERMINACIÓN DE pH EN ALIMENTOS. DETERMINATION OF pH IN FOODS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.
- NMX-F-420-1982. PRODUCTOS ALIMENTICIOS PARA USO HUMANO. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ EN LECHE FLUIDA. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.
- NMX-F-436-SCFI-2011INDUSTRIA AZUCARERA Y ALCOHOLERA - DETERMINACIÓN DE GRADOS BRUX EN JUGOS DE ESPECIES VEGETALES PRODUCTORAS DE AZÚCAR Y MATERIALES AZUCARADOS - MÉTODO DEL REFRACTÓMETRO.
- Oviedo, L., Lara, C., & Mizger, M. (2009). Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano Musa (AAB Simmonds) en el departamento de Córdoba, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología, 11(1), 1-7.
- Ramirez-Benitez J, E; Vales-Bautista T, E; Caamal-Velázquez U; Lizama G; Rodriguez-Avila N, L (2016). Producción de biomasa en la fermentación de leche por gránulos de kéfir. Revista del Centro Graduados e Investigación, Instituto Tecnológico de Mérida, vol. 31, pag 187-188.
- Ramos S, J; Martinez J, F (2014). Estandarización de una técnica cuantitativa para la determinación de etanol. Departamento de ingeniería Agroindustrial, Universidad Politécnica de Guanajuato.
- RODRÍGUEZ-FIGUEROA, JOSÉ CARLOS; NORIEGA-RODRÍGUE Z, JUAN ANTONIO; LUCERO-ACUÑA, ARMANDO; TEJEDA-MANSIR, 2017, ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD MULTIFUNCIONAL DEL KÉFIR INTERCIENCIA, vol. 42
- Rubio, M. T., Lappe, P., Wachter, C., y Ulloa, M. (1993). Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con tibicos. Revista Latinoamericana de Microbiología 35, 19-31.
- Sánchez J; Martínez E (2012). Determinación de Biomasa, laboratorio de biotecnología de los productos agroindustriales, Universidad de Trujillo.