

ESTUDIO EXPLORATORIO DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN DE UN INÓCULO DE KÉFIR

Trabajo presentado en el XIV Congreso Panamericano de la Leche. Puerto Varas, Chile, 25 al 29 de abril de 2016



RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estandarizar las condiciones de fermentación para la elaboración de kéfir, dado que el fermento tiene una composición compleja y variable. Se preparó kéfir a partir de un inóculo fresco usando leche UAT (UHT) comercial, parcialmente descremada (tenor graso 1,5%). Se sembró el inóculo en frascos individuales con 10 ml de leche para mantener constante la proporción de inóculo a lo largo del tiempo. Se realizaron diferentes tratamientos, considerando como variables la temperatura de incubación (25, 30 y 35°C) y la cantidad de fermento (10 y 20% m/m de inóculo). La incubación se realizó durante 24 horas y la fermentación se inhibió enfriando a las muestras a 8°C. El proceso de fermentación fue monitoreado a la hora 1,

Marchini¹ M., Sanmartino¹ D., Castagna¹ L., Rodríguez¹ G., Pietrafesa¹ S., Jornet Rabán¹ M.C. y Farías² M.E.

¹Tecnología de Transformación de Leche - Departamento de Tecnología - Universidad Nacional de Luján. Luján, Argentina.

²Laboratorio de Análisis Avanzados de Alimentos. Departamento de Tecnología. Universidad Nacional de Luján. Luján, Argentina.
marchini@unlu.edu.ar - efarias@unlu.edu.ar

2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 24. A cada tiempo se midió el pH y la acidez del kéfir. Los resultados mostraron una dependencia de estos parámetros con las condiciones de la fermentación. Se realizó un ensayo estadístico multivariado de las variables temperatura, tiempo y porcentaje de inóculo para encontrar las condiciones óptimas para la fermentación. Si bien estas condiciones son similares a las encontradas en la bibliografía, son intrínsecas de este sistema en particular.

Palabras clave: kefir, producción, parámetros, análisis multivariado.

INTRODUCCIÓN

El kéfir es una leche fermentada que contiene aproximadamente un 1% de ácido láctico y entre un 0,3–1% de etanol, que se obtiene mediante la acción de un fermento constituido por granos que son estructuras macroscópicas compuestas de proteína y un polisacárido denominado kefirano y una compleja microbiota representada principalmente por lactobacilos y lactococos, levaduras y bacterias fermentadoras de ácido acético que coexisten en una asociación simbiótica (Garrote, Abraham & De Antoni, 2010; Hamet, Piermaria & Abraham, 2015).

Dado que el consumo de este producto no está difundido en los países occidentales, no existe producción a escala industrial o semi-industrial. Consecuentemente, no existen condiciones de elabora-

ción que podrían tomarse como estándares o bien como un marco referencial.

Uno de los motivos por lo que es difícil estandarizar la producción es por la variabilidad de la composición y las características de los granos de kéfir, cosa que no sucede en otros países, por ejemplo del Este de Europa, donde sí hay producción industrial y se trabaja con fermento liofilizado. Por ello, es de gran interés estudiar el comportamiento de un determinado fermento durante la fermentación y así conocer parámetros de proceso que podrían ser considerados como óptimos para dicho fermento. En la Argentina no es fácil conseguir los granos, por lo cual se establecen cadenas de donantes y receptores del material para la elaboración hogareña y consumo propio. Esto hace que los productos elaborados y consumidos tengan características diferentes en función fundamentalmente del nivel de acidez y la textura del producto, puesto que obviamente el proceso no ocurre en condiciones controladas.

Desde el Laboratorio de Bacterias Lácticas de la Universidad Nacional de Luján se nos proveyó de un fermento de origen mixto. A fin de poder estandarizar la metodología de elaboración y establecer los parámetros óptimos para elaborar un producto que responda a los requisitos de la normativa vigente, se realizó un estudio exploratorio para optimizar, a través de un aná-

lisis estadístico multivariado, las condiciones de temperatura, tiempo y cantidad de inóculo para obtener un producto de calidad constante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la elaboración de la leche fermentada se utilizó leche UAT (UHT) comercial, parcialmente descremada (tenor graso 1,5%). Los gránulos de kéfir, de morfología cuasi esférica y tamaño medio, fueron provistos como fermento fresco por un miembro del Laboratorio de Bacterias Lácticas de la Universidad Nacional de Luján. La incubación se realizó en estufa Drier Box marca Peet Lab, modelo DHG 9053 A y para frenar la fermentación se utilizó un refrigerador convencional marca Peabody.

Conservación y acondicionamiento de los gránulos de kéfir

El fermento utilizado en este trabajo fue provisto fresco, conservado en leche a temperatura de refrigeración y se lo conservó en similares condiciones con renovaciones frecuentes de la leche. Se trata de un cultivo mixto, compuesto originalmente de gránulos de diferente procedencia. Previo a cada elaboración se procedió a activar el fermento incubando a 25°C durante 24 horas.

INGENIERÍA SIRI CONSULTORA S.A.

PROYECTOS Y PERFORACIONES
 Hacemos ingeniería en recursos hídricos, diseñando, asesorando, proyectando, fabricando y comercializando servicios, productos y equipos para el manejo y gestión de aguas y efluentes.

EQUIPOS DE BOMBEO
 Somos distribuidores oficiales de equipos de bombeo Grundfos y equipos sanitarios GEA-Hilge, entre otras marcas.

TRATAMIENTO DE EFLUENTES
 Plantas compactas para efluentes líquidos, domésticos e industriales, ofreciendo una solución adecuada para cada exigencia.

OSMOSIS INVERSA
 La ingeniería, el desarrollo y el diseño aplicado, han dado como resultado una gama de productos para aplicación y uso industrial, consumo humano y consumo animal.

Juan F. Seguí 42
 El Trébol (2535) - Santa Fe
 (03401) 421260
 (03401) 420886
 ventas@ingsiri.com.ar
 www.ingsiriconsultora.com.ar

Elaboración del kéfir

Se elaboró la leche fermentada a escala de laboratorio, inoculando los gránulos en la leche comercial. Se sembró el inóculo en frascos individuales con 10 ml de leche, lo cual permitió mantener constante la proporción de inóculo a lo largo del tiempo. Se realizaron diferentes tratamientos considerando como variables la temperatura de incubación (25, 30 y 35°C) y la cantidad de fermento (10 y 20 % m/m de inóculo). En todas las instancias se trabajó con duplicados. La incubación se realizó durante 24 horas y la fermentación se inhibió enfriando a las muestras a 8°C. El proceso de fermentación fue monitoreado a la hora 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 24. En cada uno de los tiempos considerados se procedió a colar el producto de la fermentación a efectos de separar los gránulos de la leche fermentada. De cada fracción de la bebida se tomaron dos alícuotas para determinar pH y acidez. Los gránulos fueron colectados todos juntos, puestos en leche fresca y conservados a temperatura de refrigeración.

Acidez titulable y pH

La acidez (g de ácido láctico/100g) se determinó titulando con NaOH 0,1 N, según FIL 150:1991. Los valores de pH se obtuvieron con un pHmetro digital marca Adwa modelo AD8000.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron a través de un análisis multivariado con el software SPSS para Windows (versión 15.0; IBM, Inc., Chicago, IL, USA).

Se realizó una regresión lineal simple para una variable dependiente y (tiempo necesario en alcanzar 1 g de ácido láctico de acidez en 100 g de producto), usando las variables dependientes, x, (temperatura (T) y porcentaje de inóculo (I)). El modelo fue el siguiente:

$$y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 I + \varepsilon \quad (\text{Ecuación 1})$$

dónde β_0 , β_1 y β_2 son los parámetros de regresión de la ecuación estimados por el análisis y ε es la desviación inexplicable del valor observado y el valor predicho de "y", llamado residual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la evolución del pH durante la fermentación del kéfir. Puede observarse, como era esperado, una disminución del pH con el tiempo. Si bien a las 24 horas de incubación ambos porcentajes de inóculo alcanzaron valores de pH similares, la disminución fue más pronunciada para un mayor porcentaje de inóculo. Además, como puede observarse en la misma figura 1, la temperatura ejerció un importante efecto en la velocidad de fermentación, siguiendo el orden 35°C > 30°C > 25°C.

La Figura 2 muestra la evolución de la acidez con respecto a la temperatura de incubación y el porcentaje de inóculo utilizado. Como puede apreciarse, la acidez se incrementó durante el tiempo de la fermentación y los valores máximos alcanzados estuvieron relacionados con la temperatura de incubación. La normativa vigente en Mercosur (Mercosur, 2016) así como el Código Alimentario Argentino (CAA, 2016) fijan la acidez del kéfir en un valor <1 g de ácido por 100 g de producto. Considerando el valor de corte de 1 para la acidez a los fines prácticos, se evidencia que el tiempo de fermentación de 24 h fue excesivo para los ensayos llevados a cabo a 35°C.

Se obtuvo a partir de las figuras 1 y 2 el tiempo requerido para alcanzar 1 g de ácido láctico en 100 g de producto y el pH 4,4 (considerado por algunos autores como el pH final del kéfir). Estos datos se graficaron en la figura 3.

FIGURA 1 - Evolución del pH durante la fermentación de la leche con los gránulos de kéfir a diferentes temperaturas (25, 30 y 35°C) para (A) 10 y (B) 20% (m/m) de inóculo

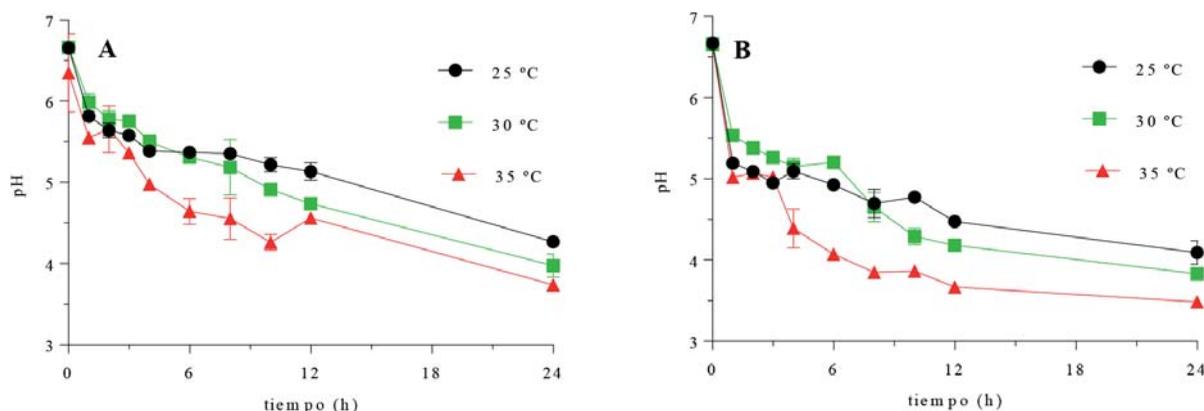
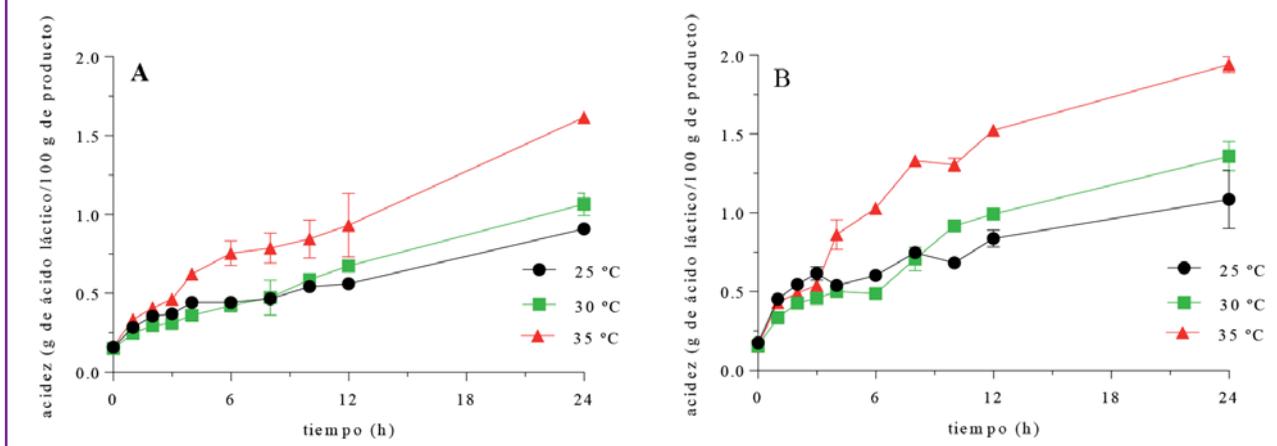


FIGURA 2 - Evolución de la acidez durante la fermentación de la leche con los gránulos de kéfir a diferentes temperaturas (25, 30 y 35°C) para (A) 10 y (B) 20% (m/m) de inóculo



Las curvas rectilíneas obtenidas muestran como el tiempo requerido en terminar el producto dependió de la temperatura y el porcentaje de inóculo, siendo mayor a la temperatura de 25 °C. Por otro lado, la figura 3 visualiza la relación directa existente entre el tiempo necesario en alcanzar la acidez y el tiempo necesario para alcanzar el pH de 4,4. Esta correlación directa fue significativa a un nivel de significación $P < 0,01$.

A partir del análisis de regresión lineal simple se halló una ecuación (ver Ecuación 1) que predice el tiempo en que tardará el fermento en llegar a la acidez de 1 g/ 100 de producto, a partir de la temperatura de fermentación y la cantidad de inóculo.

$$Y = 62,667 - 1,2 T - 0,767 I \quad (\text{Ecuación 2})$$

El coeficiente de correlación fue del 0,982, que significó que el 98,2% de los datos fueron ajustados con la Ecuación 2.



Diagramma S.A.

BIOTECNOLOGÍA

- Fermentos Lácticos
- Fermentos Cárnicos
- Inoculantes para ensilados
- Probióticos
- Antimicrobianos
- Colorantes para productos lácteos



San Lorenzo 1055 | 3000 | Santa Fe | Tel. 0342. 4584245 / Fax. 0342. 4598436

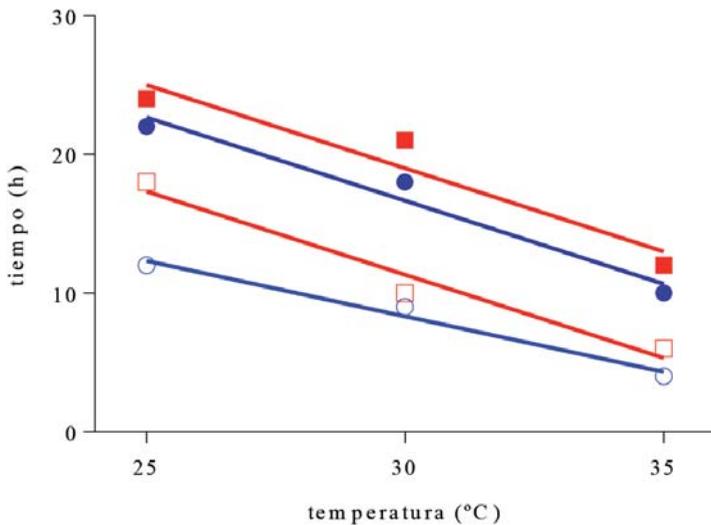
www.diagramma.com.ar



TABLA 1 - Coeficientes de regresión y significación del análisis de los parámetros. La variable dependiente es el tiempo necesario en alcanzar la acidez requerida "y".

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
	β	Error típ.	Beta	B	B	Error típ.
Constante	62,667	5,551			11,289	0,001
Temperatura	-1,200	0,170	-0,773	-7,060		0,006
Inóculo	-0,767	0,139	-0,605	-5,524		0,012

FIGURA 3 - Tiempo requerido para alcanzar la acidez de 1 g de ácido láctico en 100 g de producto con los siguientes porcentajes de inóculo: (■) 10 y (●) 20% (p/p) y tiempo requerido para alcanzar en el producto el valor de pH de 4,4 con los siguientes porcentajes de inóculo: (□) 10 y (○) 20% (p/p) en función de la temperatura de incubación.



CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos permiten establecer las condiciones para estandarizar una elaboración de kéfir con el inóculo ensayado y teniendo en cuenta los requisitos legales para el producto final.
- Esta información permitiría comenzar a trabajar en el escalado para, a futuro y con mayor cantidad de biomasa, producir la leche fermentada en la planta piloto de la Universidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Ing. Laura Fantuzzi, a los investigadores del Laboratorio de Bacterias Lácticas y al Departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján y a la ANPCyT de la República Argentina (Proyecto PICT 2014-1402).

REFERENCIAS

- CAA. (2016). Código Alimentario Argentino. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp. In).
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2010). Microbial interactions in kefir: a natural probiotic drink. In F. Mozzi, R. Raya, & M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria* (pp. 327-340). Ames, USA: Blackwell Publishing. In).
- Hamet, M. F., Piermaria, J. A., & Abraham, A. G. (2015). Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 129-135.
- MERCOSUR. Normativa vigente (2016). Resolución Grupo Mercado Común N° 47/97 - Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de Leches Fermentadas. http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_47-97.pdf

XIII

CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA E HIGIENE DE ALIMENTOS

SEPTIEMBRE 27 AL 30 DE 2016

HOTEL INTERCONTINENTAL MEDELLÍN COLOMBIA

Inscríbete y participa

en el **XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos**, el más importante de Latinoamérica

ORGANIZAN

www.colmic2016.com

INFORMES 320 19 99
extensión 221
Inscripciones online [clic aquí](#)