

*Universidad Nacional del Nordeste*

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes- Argentina

## **TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

### **-MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA-**

**OPCIÓN:** SALUD PÚBLICA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.

**TEMA:** Caracterización físico-química y nutricional del kéfir de leche.

**TUTOR INTERNO:** M.V. Vazquez Acosta, Laura Mariel

**TUTOR EXTERNO:** M.V. Obregón, Gladys Roxana Elizabeth

**RESIDENTE:** Segovia Espindola, Luz Nohelia

**E-MAIL:** [luznoheliasegovia@gmail.com](mailto:luznoheliasegovia@gmail.com)

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mis padres y a mi hermano, quienes con su amor y sacrificio han permitido cumplir mi sueño más grande, inculcándome el ejemplo del esfuerzo y valentía, y por anhelar siempre lo mejor para mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento se dirige a quien ha forjado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto, a Dios, por haberme dado la vida, acompañado a lo largo de mi carrera, por darme la sabiduría y fortaleza para alcanzar mis objetivos.

A mi Facultad de Ciencias Veterinarias, gracias por haberme permitido formarme en tan prestigiosa casa de estudios, y en ella, gracias a todas las personas que fueron participes de este proceso, que hoy se vería reflejado en la culminación de mi paso por la universidad.

A todo el equipo de la cátedra de Tecnología de los Alimentos, donde lleve a cabo mi trabajo final de graduación. A mis tutoras Laura Vazquez y Gladys Obregón por su gran ayuda y colaboración en cada momento de consulta y soporte en este trabajo.

## **INDICE**

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	7
Materiales y Métodos	8
Resultados y Discusión	18
Conclusión	23
Bibliografía	24

## RESUMEN

El kéfir es una bebida fermentada tradicional originaria de las regiones del Cáucaso y de Europa del Este, producido por la adición directa de gránulos de kéfir a la leche de diferentes especies animales. Las bacterias y levaduras que componen los gránulos están encerradas en un polisacárido, conocido como kefirán, y en una matriz de proteína. Durante el proceso de fermentación, las bacterias producen ácido láctico, mientras que las levaduras producen alcohol y anhídrido carbónico a partir de la lactosa. La fermentación ácido-alcohólica se realiza con uno o varios de los siguientes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y/u otras bacterias acidolácticas que, por su actividad, contribuyen a las características del producto terminado. Estos microorganismos específicos deben ser viables, activos y abundantes en el producto final. Tradicionalmente se produce mediante la adición de los búlgaros (gránulos de kéfir) a la leche previamente pasteurizada en una proporción de 2-10% para ser incubada a 20-25°C por 24 a 48 h. El objetivo del trabajo fue evaluar la composición nutricional, acidez y pH del kéfir, con diferentes porcentajes de inoculación: al 3 (T 3) y 5% (T 5); que se elaboraron a partir de leche entera de vaca utilizando gránulos de kéfir genéricos (que aún no han sido tipificados). A su vez, observar la tasa de crecimiento de dichos gránulos. Para la evaluación de la tasa de crecimiento de los búlgaros, se procedió a pesarlos cada 24 h. Se determinó humedad (H), proteína (P), grasas totales (GT), cenizas (CEN), calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) por la metodología AOAC (1990) y carbohidratos (CH) por diferencia. Con los datos obtenidos se procedió a calcular la información nutricional para éste producto, para una porción de 200 gramos. Como medida de evaluación de la fermentación se tomaron los valores de pH y acidez a las 24, 48 y 96 h. La acidez se determinó por acidimetría de Dornic y pH por peachímetro Testo®205. Los resultados se expresaron en gramos y en porcentaje de valores diarios con base a una dieta de 2000 kcal. **T (3)** GT 18 g y 33%; P 15 g y 20%; CH 10 g y 3%;  $\text{Ca}^2$  600 mg y 60% respectivamente; **T (5)** GT 16 g y 29%; P 14 g y 19%; CH 9 g y 3%;  $\text{Ca}^2$  840 mg y 84%. En cuanto al pH a las 24, 48 y 96 h los valores para el **T (3)** fueron 5,14; 4,25; 3,94 y **T (5)** 4,17; 3,95 y 3,87 respectivamente. Las mediciones de acidez a las 24, 48 y 96 h fueron **T (3)** 0,4; 0,74; 1,18 g de ácido láctico/100g y para el **T (5)** 0,7; 0,89 y 1,45 g de ácido láctico/100g de producto final. El valor energético obtenido por porción fue de 263 Kcal para el T (3) y 233,8 kcal para el T (5). El kéfir aporta beneficios para la salud cuando es administrado en cantidades adecuadas y en situaciones fisiológicas determinadas. Su composición nutricional varía según la calidad de la leche, el porcentaje de inóculo, la correcta manipulación de los gránulos, el tiempo/temperatura de fermentación, las condiciones de almacenamiento y la asociación particular de los microorganismos. Si bien se han demostrado determinados beneficios para la salud, es necesario realizar más estudios en seres humanos para determinar su eficacia. El crecimiento en peso (g) de los gránulos es excepcionalmente alta y constante día tras día.

## INTRODUCCIÓN

El kéfir tiene su origen en las montañas del Cáucaso, tibetano o mongol, donde antes de los 2000 años a.C. los granos ya se pasaban tradicionalmente de generación en generación entre las tribus, siendo considerados fuente de riqueza familiar. El nombre kéfir tiene su origen en el eslavo Keif, que significa “bienestar” o “vivir bien”, debido a la sensación general de salud y bienestar que genera en quienes lo consumen (Rosa, 2017). Es una bebida fermentada en donde los microorganismos responsables son asociaciones de bacterias y levaduras que llevan a cabo una fermentación láctica y una ligera fermentación alcohólica a partir de la lactosa de la leche (Fig. 1) y (Fig.2) (Gutiérrez, 2018).



Fig. 1: Granos de kéfir



Fig. 2: Kéfir de leche natural

La fermentación de la leche es uno de los métodos más antiguos empleados para su conservación. Permite que los nutrientes duren períodos de tiempo más prolongados y contribuye a mejorar su seguridad microbiológica, ya que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos. Son originarios del Oriente y se extendieron a través de Europa Central y Oriental, donde obtuvieron una gran aceptación por sus propiedades

organolépticas, nutricionales y medicinales. Entre estas leches fermentadas encontramos a la leche acidófila, yogur, kéfir y kumys (Sampablo, 2017).

De acuerdo con el Código Alimentario Argentino (Resolución MSyAS N°295), las leches fermentadas son productos obtenidos por medio de la coagulación y la disminución del pH de la leche o leche reconstituida a través de la fermentación láctica con cultivos de microorganismos específicos, que deben ser viables, activos y abundantes en el producto final durante su período de validez. Cuya fermentación se realiza con cultivos ácido lácticos elaborados con granos de kéfir (CAA, 1969).

### Composición del gránulo

Las bacterias y levaduras que componen los gránulos están encerradas en masas gelatinosas irregulares conocidos como kefirán, y por una matriz de proteína de color blanco o ligeramente amarillento, de consistencia elástica. Su tamaño varía desde unos pocos milímetros hasta unos 2 o 3 cm de diámetro. Su forma es semejante al pochoclo o a la inflorescencia de la coliflor, son insolubles en agua y en la mayoría de los disolventes (Florez, 2019). Si bien su composición varía dependiendo del país de origen, existe una población relativamente estable que interactúa entre sí, es decir, que tanto el crecimiento como la supervivencia de las cepas individuales, depende de la presencia mutua. Estos microorganismos sintetizan metabolitos bioactivos, que permiten el normal crecimiento del gránulo y la inhibición de microorganismos patógenos y contaminantes (Luciana, 2021).

Dentro del gránulo se encuentran distintos tipos de levaduras, fermentadoras y no fermentadoras de lactosa (Cuadro 1). La variedad más estable es *Saccharomyces cerevisiae*, especie de levadura adaptada para crecer en ambientes de bajo pH, bajo oxígeno y rico en alcohol; mientras que, *Kluyveromyces marxianus* puede verse afectada en la fermentación durante el transcurso del tiempo. En lo que respecta a las bacterias, se puede encontrar una amplia gama. Dentro de las más relevantes se encuentra el género *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* (Sampablo, 2017). La proporción de las distintas especies de bacterias se modifica a lo largo del proceso de fermentación, siendo al principio predominantes las mencionadas anteriormente, y para el final del proceso, el 80% consiste en *Lactobacillus kefiri* (Luciana, 2021). Las bacterias del ácido láctico (LAB) son las encargadas de realizar la conversión de la lactosa en ácido láctico, disminuyendo así el pH, ambiente adecuado para el crecimiento de las levaduras, y

favoreciendo la conservación de la leche. Las interacciones entre levaduras y bacterias producen la asimilación de ácido láctico, la producción de CO<sub>2</sub> y eliminación de O<sub>2</sub> y, la producción de nutrientes.

**Cuadro 1.** Principales grupos de levaduras y bacterias presentes en el granulo de kéfir.

GENEROS	ESPECIES FRECUENTES	CARACTERISTICAS
<b>LEVADURAS</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> y <i>Saccharomyces exiguum</i> .	Levaduras no fermentadoras de la lactosa, que producen alcohol y CO <sub>2</sub> a partir de glucosa.
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i> .	Levaduras fermentadoras de la lactosa. Responsables de formación de CO <sub>2</sub> y contribuyendo al característico sabor y aroma.
<b>LACTOBACILOS</b>	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. Kéfir</i> .	Heterofermentativos, predominantes en la leche fermentada.
	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> sp. <i>paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb.bifidobacterium</i> ssp.	Predomina en los granos de kéfir.
<b>LACTOCOCOS</b>	<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Lc. lactis</i> sp. <i>Cremoris</i> .	Acidifica rápidamente durante las primeras horas de fermentación.
<b>STREPTOCOCOS</b>	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>termophilus</i> .	Raramente encontrado.
<b>LEOCONOSTOC</b>	<i>Ln. mesenteroides</i> sp. <i>mesenteroides</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> sp. <i>dextranicum</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> sp. <i>cremoris</i> , <i>Ln. lactis</i>	Contribuye al sabor del kéfir.
<b>ACETOBACTER</b>	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Acetobacter rasaen</i> .	Su rol principal es mantener en simbiosis la microflora de los granos del kéfir. Incrementa la viscosidad del kéfir.

Fuente: (Florez, 2019).

Se produce en forma artesanal mediante la adición de granos de kéfir a la leche previamente pasteurizada en una proporción que varía de un 2-10% para posteriormente

ser incubada a 20-25°C por un tiempo que oscila de 24 a 48 horas (Gutiérrez, 2018). La composición nutricional del kéfir cambia según la composición de la leche, la composición microbiológica de los granos utilizados, el tiempo/temperatura de fermentación y las condiciones de almacenamiento (Rosa, 2017).

Las bacterias en conjunto con las levaduras presentes en este producto, conducen a incrementar el contenido de aminoácidos esenciales por medio de la degradación de la caseína, gracias a su actividad enzimática hidrolítica durante la fermentación (Salas, 2021). Al igual que todas las leches fermentadas, su contenido de lactosa disminuye como resultado de la fermentación que hace más asimilable su digestión. Tiene un elevado contenido en triptófano y es rico en minerales como calcio, magnesio y fósforo y vitaminas; especialmente vitaminas B12, tiamina, ácido fólico, y vitamina K (Quintana, 2011).

El kéfir ha despertado el interés de la comunidad científica debido a los beneficios para la salud, relacionados con la diversidad de bacterias probióticas presentes en él. Contribuye en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino, en la reducción de los niveles séricos de colesterol y triglicéridos, y favorece así mismo al sistema inmunitario (Yalmaz, 2022). Numerosas especies bacterianas aisladas demuestran una alta resistencia al pH bajo y a las sales biliares en el tracto gastrointestinal, y son capaces de adherirse a la mucosidad intestinal, (Cuadro 2) (Rosa, 2017).

**Cuadro 2:** Acciones de los probióticos sobre el aparato digestivo.

<b>Competición con bacterias patógenas</b>	Descenso del pH de la luz intestinal
	Secreción de péptidos antimicrobianos
	Inhibición de la colonización bacteriana
	Bloqueo de la adhesión bacteriana a las células epiteliales
<b>Mejora de la función barrera</b>	Aumento de la producción de moco
	Mejora de la integridad de la barrera intestinal
	Producción de AGCC (ácidos grasos de cadena corta)

<b>Producción de nutrientes</b>	Producción de vitaminas y minerales
<b>Inmunomodulación</b>	Efectos sobre las células epiteliales
	Efectos sobre las células dendríticas
	Efectos sobre los monocitos y macrófagos
	Efectos sobre los linfocitos

Fuente: (Sampablo, 2017)

#### Requisitos físico-químicos del kéfir:

Proteína láctea mín 2,9%, grasa láctea menos de 10%, pH 4.0 a 4.6, acidez (g de ácido láctico/100g) mín 0,6% y etanol (% v/m) 0,5 a 1,5 (Codex Alimentarius, 2003; y CAA, 1969).

#### Consumo

Tradicionalmente es una bebida muy popular en Rusia y países limítrofes, así como en Hungría y Polonia, los cuales reportaron en 1998 producciones de más de 3 millones de litros al año. La antigua Unión Soviética cuenta con el 70% del consumo mundial de esta leche fermentada.

En los últimos tiempos, resultó bastante conocido en muchos países como Suiza, Francia, Finlandia, Alemania, Grecia, Austria, Brasil, España e Israel, y recientemente se ha hecho fácilmente disponible en los EE. UU., y Japón. En otros países apenas está siendo introducido en la alimentación habitual (Quintana, 2011).

Argentina durante la crisis del 2000-2001, se vio inmersa en una fuerte caída del empleo y consecuentemente un aumento del índice de pobreza. Como resultado aumentaron la carencia de los servicios básicos de agua potable y cloacas, y de la alimentación básica. Esto generó un detrimiento en el estado de salud y específicamente un aumento en la prevalencia de enfermedades gastrointestinales, parasitosis y malnutrición en los niños pertenecientes a estos sectores. Para paliar esta difícil situación se crearon en los barrios más necesitados los “comedores comunitarios”, donde se suministraban alimentos a los niños y familias. Éstos fueron los escenarios donde se implementó en primera instancia, mediante proyectos de extensión, el suministro de probióticos de amplio espectro para prevenir la infección por patógenos intestinales, que contribuyesen al mejoramiento de la calidad de vida y salud de los niños. El interés en la divulgación del kéfir se basó en el conocimiento de los efectos

beneficios de los probióticos, su consumo fue apoyado por profesionales que se unieron para capacitar y acompañar a los encargados de los comedores comunitarios e instituciones educativas en la incorporación del kéfir a la dieta diaria, en el entrenamiento para su preparación, conservación e innovación con nuevas recetas (Fittipaldi, 2019).

A pesar de sus propiedades nutricionales, el consumo del kéfir en la población es actualmente bajo en comparación con otras bebidas fermentadas. ¿Podría ser la falta de información sobre sus beneficios o el sabor ácido lo que desalienta su consumo?

## OBJETIVOS

### Generales:

- Elaborar kéfir de leche a partir de leche de vaca.
- Evaluar las características físico-químicas y nutricionales del kéfir de leche.
- Determinar la tasa de crecimiento de los gránulos de kéfir de leche.

### Particulares:

- Elaborar flujograma de elaboración de kéfir de leche.
- Determinar las características fisicoquímicas (pH, acidez, proteína, materia grasa, carbohidratos, fibra bruta, cenizas, humedad, materia seca y calcio).
- Realizar la información nutricional del kéfir de leche.
- Determinar la tasa de crecimiento de los gránulos de kéfir. Registro en planillas cada 24 horas.

### Lugar y periodo de residencia

Las actividades se llevaron a cabo en el Laboratorio de Tecnología de los Alimentos de la FCV-UNNE, ubicada en calle Sargent Cabral 2139 de la ciudad de Corrientes durante los meses de julio-agosto de 2022.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materia prima:

- Leche cruda proveniente de la E.R.A.G.I.A (Escuela Regional de Agricultura, Ganadería e Institutos Afines), ubicada en la ruta 12 km 1.031 Corrientes-Capital.
- Gránulos de kéfir de leche, provistos por el Laboratorio de Tecnología de los Alimentos (FCV-UNNE).

### 2. Materiales y equipos

**Cuadro 3.** Lista de materiales, equipos, reactivos he insumos utilizados en el proceso de elaboración del kéfir.

Materiales	Equipos
Termómetro químico de alcohol de vidrio: rango de temperatura: -10°C a +200°C, escala mínima 2°C y largo: 30cm	Balanza analítica (0,1µg a 0,1 mg de precisión)
Vaso de precipitados de 10 ml	Balanza electrónica marca Novel Kretz (capacidad mínima 0,1 kg)
Probeta de 250 ml, 500 ml y de 1000 ml	Refrigerador R330, Marca Electrolux
Pipeta de 10 ml	Centrífuga/Olla de aluminio
Propipeta	<b>Reactivos</b>
Lactodensímetro Quevenne 20°C	Fenolftaleína al 1% / Hidróxido de sodio 9N
Medios filtrantes (tela de algodón)	pH Buffer Solution, de pH 4 y pH 7
Bureta	Agua destilada / Alcohol de 70% / Alcohol amílico
Butirómetro	Ácido sulfúrico
Anafe a gas	<b>Insumos</b>
pHmetro (Testo 250 ®)	Gránulos de Kéfir

### 3. Método

#### 3.1- Descripción del proceso de elaboración de kéfir de leche:

Recepción de la Leche: La leche pasteurizada de vaca, es empleada para la producción, sin embargo, puede utilizarse cualquier tipo de leche. Debe ser de buena calidad higiénica con buen contenido de sólidos, bajo contenido de bacterias, sin presencia de antibióticos, calostro, agua ni otras sustancias extrañas.

Higienización y/o Filtrado: conjunto de operaciones a las que se somete la leche, previa elaboración láctea, que consiste en la limpieza de los contaminantes físicos (pelos y otras partículas sólidas) y se realiza utilizando los métodos de tamización y filtración.

Pasteurización: el objetivo del tratamiento térmico es destruir microorganismos patógenos. La desventaja de someter a altas temperaturas es la disminución de la calidad en apariencia, textura y valor nutritivo de la leche. Método de pasteurización alta: 73°C durante 15 segundos.

Enfriamiento y Acondicionamiento: una vez cumplido el tiempo de tratamiento térmico se procede a enfriar la leche (temperatura de 20-25°C).

Cultivo de Gránulos de Kéfir: etapa de acondicionamiento y cultivo de los búlgaros en la leche, la proporción gránulo/leche y el tiempo de fermentación afectará la calidad del kéfir; a mayor concentración desciende el pH; aumenta la acidez y la viscosidad (porcentaje de inóculo al 3 y 5 %).

Fermentación: proceso mediante el cual la lactosa es transformada en ácido láctico y etanol, por las bacterias y levaduras presentes en los gránulos de kéfir. La leche kéfirada no se considera una bebida alcohólica ya que la concentración de etanol es ínfima. La fermentación se lleva a cabo por 24-48 horas a temperatura de 20 a 25°C. No debe superar los 30°C, ya que afecta el crecimiento de levaduras y LAB. Durante la misma los gránulos aumentan su masa.

Tamizado: consiste en separar los búlgaros de la leche. Un factor a tener en cuenta es el lavado de los gránulos entre una fermentación y otra, influyendo en el sabor y aumentando el tiempo de fermentación. Además, limita el crecimiento de ciertos microorganismos.

Maduración: permite desarrollar un sabor y aroma característico gracias al crecimiento de los microorganismos, consiste en dejar reposar a temperatura ambiente por un tiempo de 24 horas.

Filtración: el proceso de filtrado se realiza con lienzos de algodón a temperatura de refrigeración, con el objetivo de desupear la leche kéfirada y tener un producto más firme y cremoso.

Producto Final: leche fermentada con péptidos bioactivos, exopolisacáridos,  $\beta$ -galactosidasa y microorganismos con función probiótica. Es de color blanco de consistencia viscosa, con sabor ácido y dulce.

Envasado: en envases de vidrio y sometido a refrigeración puede durar de 3 a 4 días.

### 3.2- Elaboración del kéfir.

Se preparó kéfir natural a partir de leche entera de vaca. Una vez pasteurizada la leche a 73°C durante 15 segundos, se enfrió a temperatura ambiente y se inoculó con gránulos de kéfir genéricos (aun no tipificados), empleando dos porcentajes diferentes: 3 y 5% (Fig. 3). Después de inoculadas las muestras, se incubaron a 22° C por 24 horas (Fig. 4). Transcurrido dicho tiempo los búlgaros fueron retirados por tamizado de la leche kéfirada, lavados y pesados para su posterior cultivo. La leche obtenida de la fermentación pasó por un proceso de maduración que consistió en dejar reposar el producto por 24 horas a temperatura ambiente, para lograr las características físicas exigidas por el CAA, de acidez como de pH. Por último, se realizó la filtración con lienzos de algodón por 24 horas a temperatura de refrigeración (2 a 4 °C). El kéfir obtenido se caracterizó por poseer una textura cremosa, con un sabor típico a levadura, levemente agrio y con una efervescencia sutil. Posteriormente se envasó y almacenó (Fig. 5 & 6).

Como medida de evaluación de la fermentación se tomaron los valores de pH y acidez a las 24, 48 y 96 horas a partir del momento de la siembra, con tratamientos del 3 y 5%. La acidez se determinó por acidimetría de Dornic expresada en gramos de ácido láctico y pH por peachímetro Testo®205.

La tasa de crecimiento de los búlgaros se evaluó pesando los gránulos después de cada tamizado, que en este caso fue cada 24 h.



Fig. 3: Proceso de siembra



Fig. 4: Proceso de fermentación



Fig. 5: Kéfir



Fig. 6: Producto final envasado

Una vez obtenido el producto final se determinó humedad (H), proteína (P), grasas totales (GT), calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), cenizas (CEN) por la metodología AOAC (1990), y carbohidratos (CH) por diferencia. Con los datos obtenidos se procedió a calcular información nutricional para este producto.

#### Análisis químicos del kéfir de leche

1. Determinación de Humedad: utilizando el Método Gravimétrico para la determinación de sólidos totales. La humedad corresponde a la diferencia entre el peso de la muestra y el peso de los sólidos totales, cuyo valor en g/100 g se obtiene a partir del método de secado en estufa a 60°C por 48 horas (Fig. 7 y 8). Una vez desecada se tomó parte de esta muestra para realizar los demás análisis (Fig. 9).



Fig. 7: Muestra



Fig. 8: Muestra en estufa



Fig. 9: Materia seca

## 2. Determinación de Proteínas

**Fundamento:** por el método de Kjeldahl, el ácido sulfúrico concentrado efectúa la destrucción oxidativa de la materia orgánica de la muestra y la reducción del nitrógeno orgánico a amoníaco. El amonio es retenido como bisulfato de amonio y es determinado por destilación alcalina y titulación, empleando un indicador colorimétrico.

**Descripción del ensayo:** colocar en un tubo para digestión 1 gr de la muestra, 7 gr de sulfato de potasio y 0,005 gr de selenio como catalizador de la digestión y acelerador de la misma. Luego llevar a una campána para la primera digestión, agregando agua oxigenada 100 vol. y ácido sulfúrico al 98%. En el equipo de Kjeldahl, se agrega hidróxido de sodio al 10% para terminar la digestión. Una vez finalizada pasa al destilador, en el cual se encuentra un Erlenmeyer con el indicador y ácido bórico al 4% con un color fucsia el cual vira al verde una vez terminada la destilación. Por último, se pasa a titular con ácido clorhídrico mediante una bureta, gota a gota hasta que cambia al color fucsia nuevamente. Se lee el volumen y se lo multiplica por el factor 6,38 para que nos dé el porcentaje de proteína.

## 3. Butiometría de Gerber:

**Fundamento:** método analítico para la determinación del contenido graso en la leche. Basado en la propiedad que tiene el ácido sulfúrico de realizar la combustión húmeda de las proteínas y de casi todos los componentes, exceptuando la grasa, la que a su vez contribuye a separar conjuntamente con el alcohol amílico que le da nitidez e impide la formación de espuma. Se realiza con leche o derivado lácteo bien mezclada, dado que con el reposo la grasa asciende en la superficie.

**Descripción del ensayo para Butiometría de crema de leche:** pesar 5 gramos de muestra bien mezclada, en el vaso de vidrio del tapón y se introducen en el butirómetro (Fig. 10). Rellenar ácido sulfúrico (densidad: 1,522 +/- 0,005 g/ml) a través de la abertura superior del butirómetro más allá del borde superior del vaso de vidrio. Después de cerrar el butirómetro, colocarlo en baño María a 70°C, agitándolo de vez en cuando hasta que la proteína se haya disuelto completamente (Fig. 11). Añadir 1 ml de alcohol y ácido sulfúrico hasta la marca de 10%. Cerrar el butirómetro, agitarlo y colocarlo otros 10 minutos en el baño María a 70°C. Agitarlo regularmente durante este intervalo de tiempo. Después centrifugar (7min.) y regular temperatura en un baño María a 65°C. Tomar la lectura a 65°C, ajustar la columna de grasa al punto cero, tomar la lectura en el menisco inferior (Fig.12 y 13). Colocando de butirómetro a la altura de la vista y previo enrascado de la columna de grasa con el 0 de la escala, para lo cual se enrosca o se afloja el tapón, se hace la lectura y se expresa en gramos por ciento.



Fig. 10: Kéfir para Butiometría.



Fig. 11: Proceso de digestión.



Fig. 12: Enrasado de la columna de grasa.



Fig. 13: Lectura.

4. Extracto etéreo. Determinación de materia grasa por el método de Soxhlet:

**Fundamento:** la materia grasa se extrae usando éter de petróleo bajo reflujo, luego el solvente es removido por evaporación y el residuo graso es pesado.

**Descripción de ensayo:**

- a) Moler la muestra a analizar (Fig. 14).
- b) Pesar 2 gr de muestra y colocar en un cartucho de papel de filtro (Fig. 15).
- c) Verter 160 ml de éter en los balones pequeños y 310 ml en los balones grandes.  
Montar el equipo y encender las mantas en 6 para los grandes y 4 para los pequeños (Fig. 16).
- d) Pesar los balones, previo armado estos deben estar vacíos, limpios, secos y fríos.
- e) Una vez que se produjo el primer reflujo de éter, contar 4 h.
- f) Controlar la presión de agua que enfriá los refrigerantes.
- g) Una vez transcurrido las 4 h, retirar la columna cuando se encuentre llena de éter y el balón prácticamente vacío.
- h) Recuperar el éter en una botella.
- i) Una vez finalizado el proceso, llevar los balones a estufa a 100°C por una hora.
- j) Dejar enfriar en desecador y pesar.



Fig. 14: Muestra a analizar



Fig. 15: Muestra en cartucho de papel de filtro



Fig. 16: Montaje de equipo.

5. Determinación de cenizas (método gravimétrico 500°C):

**Fundamento:** las cenizas constituyen el residuo inorgánico que queda tras eliminar totalmente los compuestos orgánicos existentes en la muestra al quemarla en un horno o mufla a no más de 500 °C durante 5 horas.

**Descripción del ensayo:** pesar los crisoles vacíos en la balanza analítica, luego pesar los crisoles con 1 gr de la muestra. Llevar a la mufla a una temperatura de 550 grados durante 4 horas, agregar algunas gotas de etanol al 96% para evitar la formación de película. Esperar 24 horas para abrir la mufla y retirar la muestra. Enfriar en un desecador los crisoles con la muestra calcinada, por último, pesar en la balanza analítica.

Cálculos

La operación es:  $(P_c \times 100)/P = \text{cenizas g\%}$

P<sub>c</sub>: peso cenizas

P: peso de la muestra

6. Determinación de acidez (Método Dornic):

**Fundamento:** método cuantitativo se basa en la saturación de las funciones acidas de la leche, mediante una solución alcalina, en presencia de un indicador cromático para determinar el final, por neutralización de la reacción.

**Descripción del ensayo:** en un vaso de precipitación colocar 10 ml de leche kéfirada (Fig. 17). Agregar 5 gotas de solución alcohólica de fenolftaleína, como indicador (Fig. 18), comprobando que la solución de NaOH N/9 está enrasada en el cero, iniciar la titulación gota a gota y tras de cada adición agitar y seguir agregando hasta un color rosado persistente, como mínimo hasta 30 segundos. Leer las divisiones de la bureta del

aparato que corresponde a la solución gastada y que expresa directamente los grados Dornic de la leche, 1 grados Dornic= 1 mg de ácido láctico de la leche.



Fig. 17: Toma de muestra



Fig. 18: Titulación

#### 7. Determinación de Fibra Bruta:

**Fundamento:** este método permite determinar el contenido de fibra de la muestra, después de ser digerida con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio y calcinado el residuo. La diferencia de pesos después de la calcinación nos indica la cantidad de fibra presente.

**Descripción del ensayo:** pesar 2 gramos de muestra, colocar en un balón y adicionar 200 ml de la solución de ácido sulfúrico en ebullición y 3 gotas de antiespumante. Hervir en manta térmica por 30 minutos (Fig. 19), colar y lavar con agua destilada. Colocar el residuo nuevamente en el balón con 200 ml de solución de hidróxido de sodio y 6 gotas de antiespumante. Hervir en manta por 30 minutos. Colar y lavar. Enjuagar con 10 ml de alcohol y 10 ml de éter de petróleo. Pesar crisoles. Colocar la muestra allí y llevar a estufa 2 horas (100°C). Luego enfriar en desecador. Pesar los crisoles y llevar a mufla por 1 hora. Dejar 24 horas enfriar. Sacar de mufla y pesar.

#### Cálculos

A= Peso de crisol con el residuo seco (g)

B= Peso de crisol con la ceniza (g)

C= Peso de la muestra (g)

Contenido de fibra cruda (%)=  $100((A-B)/C)$ .



Fig. 19: Proceso de digestión sobre manta térmica.

8. Determinación de calcio:

- Tomar una alícuota de la solución problema (5 ml), y agregar el NaOH al 10%.
- Diluir el conjunto con agua destilada y agregar unas pizcas de murexida, que da color rojo cereza.
- Titular con EDTA 0,01 M hasta color violeta.
- Leer el volumen gastado en la bureta (ese volumen se denomina **V1**).
- Calcular el Ca para la alícuota:

Equivalencias:

1 mol de moléculas EDTA  $\leq \geq$  1 mol de át de calcio

1000 ml EDTA 1 M  $\leq \geq$  40 g Ca

1 ml EDTA 1 M  $\leq \geq$  0,040 g Ca

**1 ml EDTA 0,01 M  $\leq \geq$  0,00040 g Ca**

**Ca en alícuota: V1 (ml). fc  $\times$  0,00040 (g/ml)**

- Llevar el resultado mg L<sup>-1</sup>

9. pH (Testo 250®): instrumento científico que mide la actividad del ion hidrógeno en soluciones acuosas, indicando su grado de acidez o alcalinidad expresada como pH. El medidor de pH mide la diferencia de potencial eléctrico entre un electrodo de pH y un electrodo de referencia. Esta diferencia de potencial eléctrico se relaciona con la acidez o el pH de la solución (Fig. 20).



Fig. 20: Determinación de pH

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizó el flujograma de elaboración (Fig. 21) para el kéfir teniendo en cuenta los insumos e instalaciones del Laboratorio de Tecnología de los Alimentos.

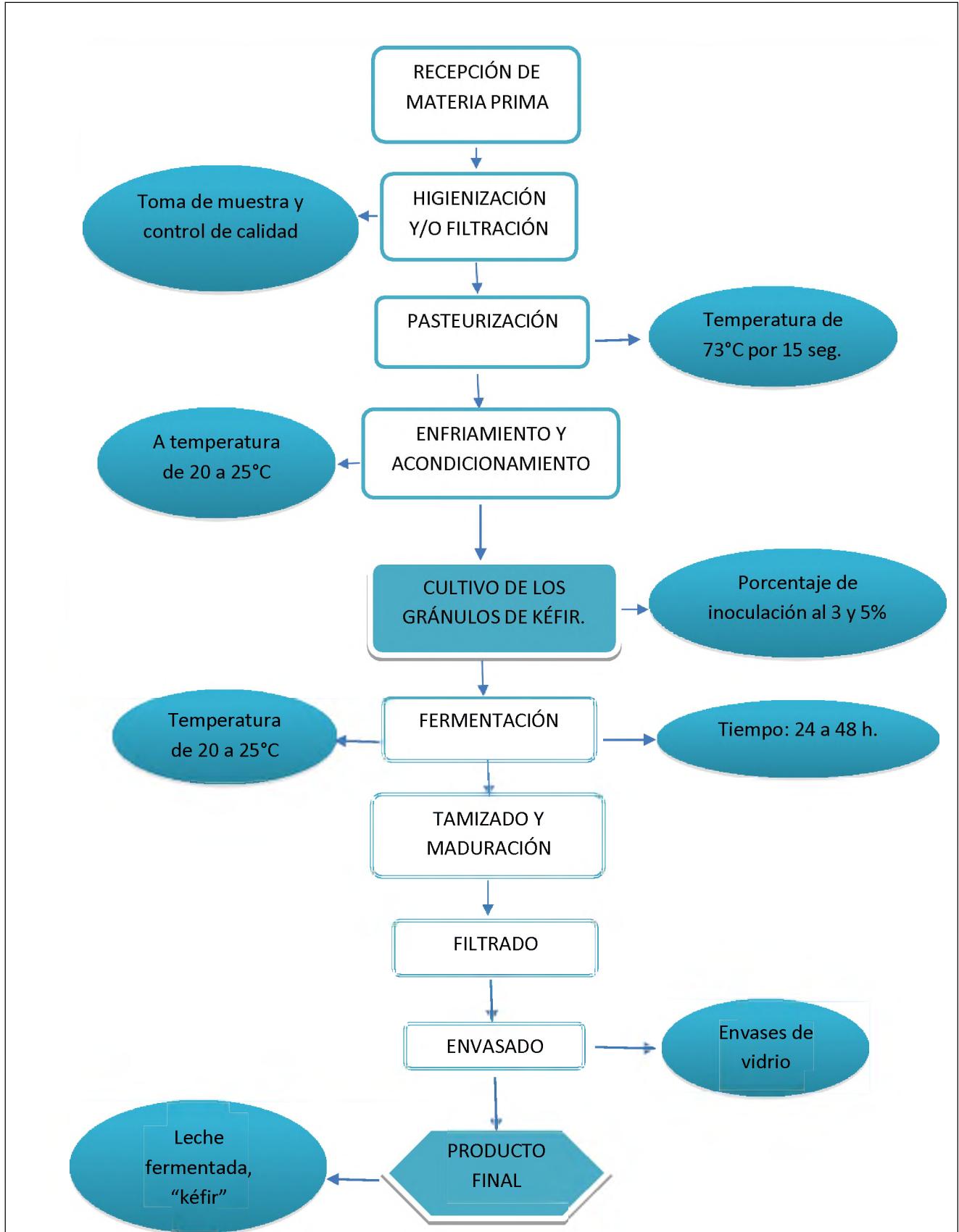


Figura 21: Flujograma de elaboración del kéfir.

Los resultados de información nutricional se resumen en los cuadros 4 y 5 para T3; 6 y 7 para T5. Se expresaron en gramos y en porcentaje de valores diarios con base a una dieta de 2000 kcal.

#### Cuadro 4. Tratamiento al 3%

##### *ANALISIS FISICO QUIMICO (\*1)*

Compuestos	(%)
<b>Humedad (H)</b>	<b>77,81</b>
<b>Materia seca (MS)</b>	<b>22,19</b>
<b>Proteína Bruta (PB)</b>	<b>7,5</b>
<b>Grasas Totales</b>	<b>9,1</b>
<b>Cenizas</b>	<b>0,7</b>
<b>Carbohidratos</b>	<b>4,9</b>
<b>Calcio</b>	<b>0,30</b>

#### Cuadro 5. Información Nutricional (\*2)

Porción 200 gramos	Cantidad por porción	% Valor Diario (*)
<b>Valor Energético</b>	<b>263 Kcal. = 1095 KJ.</b>	<b>13</b>
<b>Grasas Totales</b>	<b>18 g.</b>	<b>33</b>
<b>Proteínas</b>	<b>15 g.</b>	<b>20</b>
<b>Carbohidratos</b>	<b>10 g.</b>	<b>3</b>
<b>Calcio</b>	<b>600 mg.</b>	<b>60</b>

No aporta cantidades significativas de fibra bruta.

(\*) % Valores diarios con base en una dieta de 2000 kcal u 8400 KJ. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas.

#### Cuadro 6. Tratamiento al 5%

##### *ANALISIS FISICO QUIMICO (\*1)*

Compuestos	(%)
<b>Humedad (H)</b>	<b>79,9</b>
<b>Materia seca (MS)</b>	<b>20,1</b>
<b>Proteína Bruta (PB)</b>	<b>6,84</b>
<b>Grasas Totales</b>	<b>7,9</b>

<b>Cenizas</b>	<b>0,75</b>
<b>Carbohidratos</b>	<b>4,61</b>
<b>Calcio</b>	<b>0,42</b>

**Cuadro 7. Información Nutricional (\*2)**

<b>Porción 200 gramos</b>	<b>Cantidad por porción</b>	<b>% Valor Diario (*)</b>
<b>Valor Energético</b>	<b>233,8 Kcal. = 973,56 KJ.</b>	<b>12</b>
<b>Grasas Totales</b>	<b>16 g.</b>	<b>29</b>
<b>Proteínas</b>	<b>14 g.</b>	<b>19</b>
<b>Carbohidratos</b>	<b>9 g.</b>	<b>3</b>
<b>Calcio</b>	<b>840 mg.</b>	<b>84</b>

No aporta cantidades significativas de fibra bruta.

(\*) % Valores diarios con base en una dieta de 2000 kcal u 8400 KJ. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas.

Los resultados obtenidos superan los valores mínimos requeridos por el CAA y Codex Alimentarius. Según los trabajos consultados hasta el momento, no sería posible estandarizar las propiedades de la bebida, dado que existen varios factores que contribuyen a estas diferencias. Se ha demostrado que los microorganismos que conforman el gránulo varían según la región y país de origen, además, de las buenas prácticas de manufactura (BPM) en el proceso de elaboración, existen variables como la temperatura, tiempo de fermentación, agitación, proporción gránulos/leche que modifican la calidad del producto final, descripto por Luciana (2021), quién realizó la tipificación de los gránulos y descripción del proceso de producción del kéfir.

#### **Interpretación de los resultados de pH y acidez.**

En el cuadro 8 y 9, se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la variación del pH y acidez expresados en gramos de ácido láctico/100 gramos de producto final, en diferentes períodos de tiempo y diferentes porcentajes de inoculación. En las primeras 24 horas de fermentación, se pudo observar una diferencia de un punto entre el T3 y el T5, ya que el primero arrojó un valor de 5,14 mientras el segundo dio 4,17; sin embargo, ambos llegaron a valores muy cercanos a las 96 horas post-siembra. Estos valores de pH son inferiores al resultado descripto por Salas *et. al* (2021), quien obtuvo un  $5 \pm 5,5$  con un porcentaje de inóculo del 5% en su ensayo de elaboración de kéfir con leche bovina.

**Cuadro 8 y 9.** Valores de acidez y pH de kéfir con diferentes porcentajes inóculo.

Tratamiento al 3%	24h.	48h.	96h.
pH	5,14	4,25	3,94
Acidez	0,4	0,74	1,18

Tratamiento al 5%	24h.	48h.	96h.
pH	4,17	3,95	3,87
Acidez	0,71	0,9	1,45

#### Crecimiento en peso (g) de los granos de Kéfir:

Podemos observar que la tasa de crecimiento de los gránulos de kéfir en 24 horas es alrededor de un 7 a 8% del peso correspondiente (Fig. 22), habiendo diferencias con lo descripto por Quintana (2011), quien obtuvo 10% de crecimiento por semana.



Fig. 22: Crecimiento diario de los granos de kéfir.

## CONCLUSIÓN

El kéfir como alimento fermentado tiene características probióticas, es decir, que contiene microorganismos vivos que aportan beneficios para la salud cuando es administrado en cantidades adecuadas y en situaciones fisiológicas determinadas. La relación inóculo/leche, modifica tanto la viscosidad como el pH y acidez del producto final. A mayor concentración de inóculo, desciende el pH y la viscosidad/acidez aumentan. Con respecto a la producción tanto artesanal como industrial del kéfir, los intentos por lograr una bebida estandarizada para ser comercializada no han tenido éxito, dado que los procesos de fermentación son inestables, causando que el gránulo pierda vigorosidad. Por lo tanto, se requiere de estudios adicionales para obtener una mejor comprensión acerca de todo el proceso, permitiendo la preparación de lotes más estables. El aporte nutricional depende de la calidad de la leche, composición microbiológica de los búlgaros, la correcta manipulación de los gránulos y el minucioso control de variables como la temperatura, tiempo de fermentación y porcentaje de inoculación. Si bien se han demostrado determinados beneficios para la salud, es necesario realizar más estudios en seres humanos para determinar su eficacia. Por último, destacar que se encuentra gran cantidad de información empírica disponible, no obstante, estos conocimientos no están basados en estudios científicos que los respalden. Por lo tanto, se espera que estos interrogantes sean un incentivo y motiven futuras investigaciones sobre el proceso de elaboración del kéfir.

## BIBLIOGRAFÍA

- CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO CAA. 1969. Ley N 18.284. Buenos Aires (Argentina).
- CODEX ALIMENTARIUS. 1963. Norma del Codex para leches fermentadas CXS 243-2003. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2085s.pdf>
- FITTIPALDI A. 2019. Proyecto Kéfir, Un Probiótico Solidario. Universidad Nacional de La Plata. Programa de Extensión de Alimentos y Salud - Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos - Facultad de Ciencias Exactas. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/112753/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/112753/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- FLOREZ HUARACHA K. 2019. Obtención de una bebida fermentada tipo kéfir a partir de lactosuero ácido y leche. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Escuela de Posgrado Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Disponible en: [http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/5245/253T2019\\_1233\\_TC](http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/5245/253T2019_1233_TC)
- GUTIERREZ MENDEZ N; PEREZ FERNANDEZ Q; CANALES I. C; OYAGUE J. M; NEVAREZ MOORILLON. 2018. Efecto del porcentaje del inóculo y del tiempo de incubación sobre las características físico-químicas del kéfir. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas. Disponible en: [https://smbb.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA\\_VI/C\\_ARTEL/CVI-21.pdf](https://smbb.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_VI/C_ARTEL/CVI-21.pdf)
- LUCIANA G; KAIMEN A; LOPEZ F; MORENO L. I; ALFAGEME M. C; DROLAS M. C. 2021. Descripción y análisis de las técnicas de producción de kéfir. Revista nutrición investiga. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Escuela de Nutrición, Buenos Aires, Argentina. Disponible en: [http://escuelanutricion.fmed.uba.ar/revistani/pdf/21b/an/927\\_c.pdf](http://escuelanutricion.fmed.uba.ar/revistani/pdf/21b/an/927_c.pdf)
- QUINTANA LÓPEZ A. V. 2011. Caracterización físicoquímica y nutricional de leches fermentadas de cabra. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia, Departamento de Nutrición y Bromatología. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=62642>

- SALAS AVENDANO X. A; TORRES BARJA I. R. 2021. Evaluación de la viabilidad de bacterias ácido-lácticas y levaduras; y composición nutricional del kéfir de leche durante su almacenamiento en refrigeración. Tesis. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC). Facultad de Ciencias de la Salud Programa Académico de Nutrición y Dietética. Disponible en: <https://repositorioacademico.upc.edu.pe/handle/10757/658799>
- SAMPABLO NUÑEZ V. 2017. Leches fermentadas: tradición e innovación. Tesis de Grado. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/56933/>
- ROSA D; DIAS M; GRZESKOWIAK L; REIS S; CONCECÃO L; PELUZIO M. 2017. Kéfir de leche: beneficios nutricionales, microbiológicos y para la salud. Revisiones de investigaciones sobre nutrición. Pág. 82-96. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/nutrition-research-reviews/article/milk-kefir-nutritional-microbiologic-and-health-benefits/1393DC2B8E5F08B0BE7BD58F030D387B>
- YALMAZ I; ARSLAN B. 2022. El efecto del consumo de kéfir en el perfil lipídico de personas con propiedades normales y dislipidémicas: un ensayo controlado aleatorizado. Revista Nutrición. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/rn/a/9hmwgFsPJD3nxrj9HWpjpyh/?lang=en>