

## ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LAS TEMPERATURAS CONSTANTE Y VARIABLE AMBIENTE EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA PROVENIENTE DE LA MICROBIOTA DEL GRANO DE KÉFIR

### A comparative study of the effect of constant and environmental temperatures in the biomass production from the microbiota of kefir grain

Fermín Arévalo Ortiz<sup>1</sup>, Gladys Arias Arroyo<sup>1</sup>

#### RESUMEN

En este estudio comparativo se evaluó el efecto de la temperatura en la fermentación y producción de biomasa proveniente de la microbiota del grano de kéfir utilizando leche entera como sustrato. Se empleó inóculo a una concentración de 5% y se dejó fermentar por 4 ciclos de fermentación a razón de 24 horas por ciclo, para posteriormente evaluar los resultados de fermentación a las dos temperaturas dadas: constante a 24 °C y variable entre 19 y 26 °C. La evaluación reveló que no había diferencia significativa entre las temperaturas de fermentación constante y variable respecto al peso, es decir respecto al rendimiento en biomasa, aunque sí se observó diferencias con respecto a la consistencia de los granos de kéfir. Los resultados demostraron que los granos de kéfir obtenidos a temperatura variable de fermentación, es decir a temperatura ambiente entre 19 y 26 °C, resultó tener mayor consistencia que los granos fermentados a temperatura constante de 24 °C. Finalmente, este estudio demostró que por lo menos en nuestro medio, es decir el Perú, en lugares donde no se presentan climas con temperaturas extremas, la fermentación de los granos de kéfir con el propósito de producir Kéfir y biomasa a temperatura ambiente, es viable y de gran importancia, dado que se puede realizar sin gastar energía adicional en el proceso.

**Palabras clave:** Biomasa, fermentación, microbiota, kéfir, temperatura de fermentación.

#### SUMMARY

In this comparative study the effect of the temperature was evaluated in the fermentation and production of biomass coming from the microbiote of the grain of kéfir using whole milk as substrate. Inocule was used at 5% of concentration and it was allowed to ferment for 4 cycles of fermentation at reason of 24 hours per cycle for being the results evaluated later at two given temperatures: constant at 24 °C and variable, between 19 and 26 °C. The evaluation revealed that there was not a significant difference between constant and variable temperatures of fermentation concerning to the weight, that is to say concerning to the yield in biomass, although there was a difference respect to grains of kéfir consistency. The results demonstrated that the grains of kéfir obtained at variable temperature of fermentation, it means at ambient temperature between 19 and 26 °C, they turned out to have bigger consistency than grains fermented at constant temperature of 24 °C. Finally, this study demonstrated that at least in our country, Peru, in places where climates do not present extreme temperatures, the fermentation of grains of kéfir with the purpose of producing Kefir and biomass at ambient temperature, is viable and of great importance, since it can be carried out without spending additional energy in the process.

**Key words:** biomass, fermentation, microbiote, kefir, temperature of fermentation.

#### INTRODUCCIÓN

La necesidad de calor y por ende el gasto de energía adicional en la industria de los derivados lácteos fermentados como son el yogurt y otras leches fermentadas es un inconveniente en los costos de

producción, por lo que es necesario explorar otras alternativas de fermentación láctea que no tenga este inconveniente. Aquí es donde el kéfir se hace presente, pues es bastante conocido que los granos de kéfir pueden fermentar la leche a temperatura ambiente.

<sup>1</sup> Laboratorio de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Sin embargo la realidad actual y el devenir de los alimentos funcionales y los nutracéuticos ha traído como consecuencia la utilización no sólo del kéfir como alimento funcional; sino también la utilización de los mismos granos de kéfir como suplemento dietético convertido en nutracéutico.

La temperatura óptima de fermentación del kéfir es un rango comprendido entre 20 a 25 °C<sup>1</sup>. Sin embargo, no se sabe cómo la temperatura afecta la fermentación al mismo grano de kéfir en sí. Se sabe que el grano de kéfir está formado por una microbiota mixta de bacterias y levaduras y cada especie microbiana tiene una temperatura óptima de fermentación, por lo que esta fermentación mixta se ve afectada por la temperatura y algunos metabolitos producidos durante el proceso de fermentación. También se sabe que para los microorganismos existe una temperatura mínima de crecimiento, por debajo de la cual no existe crecimiento; una temperatura óptima, a la cual el crecimiento es el más rápido posible; y una temperatura máxima, rebasada la cual no existe crecimiento alguno. Estas tres temperaturas, a menudo denominadas temperaturas cardinales, son características de cada microorganismo y puede variar ligeramente de acuerdo a la composición del medio de cultivo<sup>2</sup>.

Existen razones suficientes para creer que este amplio rango de temperatura de fermentación mixta de bacterias y levaduras favorece la producción y utilización de metabolitos que pueden ser considerados secuenciales a lo largo de la fermentación. Un claro ejemplo lo constituye la preparación de la cerveza belga "lambic" en donde la infusión de malta fermenta espontáneamente y es colonizada por varias enterobacterias. Después de unos 40 días las bacterias entéricas son reemplazadas por levaduras *Saccharomyces*. Entonces comienza un tercer periodo de fermentación caracterizado por la presencia de *Pediococos*. Finalmente, tras 6 a 8 meses del inicio de la fermentación, las levaduras *Brettanomyces* afectan el cuarto periodo de fermentación<sup>3</sup>. Entonces, es de esperar que en el caso de los granos de kéfir, también estas secuencias alternadas de fermentación, las mismas que son influenciadas por las variaciones de temperatura, sean de importancia para el desarrollo normal de las mismas, pero en un corto tiempo.

El pH óptimo de fermentación para los granos de kéfir es 4.4<sup>4</sup> y respecto a la concentración de inóculo, Sasaki<sup>5</sup> recomienda una concentración de inóculo de 5% para 24 horas de fermentación. Así pues,

bajo estas condiciones, los cultivos a temperatura variable dado por el ambiente y los de temperatura constante a 24 °C, realizados en estufa pueden ser debidamente comparados.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la temperatura constante y variable en la producción de biomasa a partir de los granos de kéfir con la finalidad de poder obtenerla sin gasto de energía adicional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Granos de kéfir

Se recolectó cuatro muestras de granos de kéfir de cuatro diferentes casas naturistas de la ciudad de Lima. Se tomó 10 g de cada muestra y se procedió a juntarlas, de tal manera que pasaron a ser una sola muestra de 40 g.

### Crecimiento y control del iniciador o "starter" de la microbiota de los granos de kéfir

Los 40 g de muestra inicial de los granos de kéfir, se cultivaron en leche fresca pasteurizada LA MOLINA® proveniente del establo de la Universidad Agraria La Molina y certificada por SENASA, a temperatura ambiente (entre 19 y 26 °C), iniciando con una concentración de 5% de agente biológico respecto al medio de cultivo, tal como lo recomienda Sasaki<sup>5</sup> y cambiando el medio de cultivo cada 24 horas; pero siempre reiniciando el proceso con una concentración de 5% de agente biológico respecto al medio de cultivo hasta obtener unos 100 g de agente biológico para los ensayos respectivos.

Preparación del inóculo. Una vez obtenido los 100 g o más de cultivo iniciador o *starter*, los granos de kéfir fueron lavados con agua por tres veces y se dejaron escurrir en un colador, con malla No. 35 ASTM, durante 20 minutos. Los granos de kéfir así obtenidos fueron los que se utilizaron como inóculos.

Procedimiento experimental. Se formaron los grupos A y B, tal como se detalla a continuación:

### Grupo A

- Se tomó seis matraces de 500 mL de capacidad con 200 mL de medio de cultivo, es decir leche LA MOLINA®, previamente hervida y desnatada.

- Se tomó 10 gramos de inóculo para cada matraz y se llevó a fermentar a una estufa Memmert, a una temperatura constante de 24 °C con una agitación a las 12 horas.
- Cada 24 horas se cambió el medio de cultivo durante 96 horas.
- Transcurridas las 96 horas, la biomasa (granos de kéfir) fue retirada del medio de cultivo, se lavó con agua por tres veces y se dejó escurrir en un vaso de precipitación por espacio de 20 minutos con una inclinación de 45°. Se tomó datos del peso húmedo.
- Seguidamente la biomasa fue extendida en una tela limpia para que se seque a temperatura ambiente por espacio de 96 horas; luego fue llevado a la estufa a 50 °C hasta peso constante. Se tomó datos de peso seco.

- También se tomó datos de pH inicial y pH final del proceso de fermentación.

**Grupo B**

Se procedió exactamente igual que para el Grupo A, con la única diferencia de que la fermentación se realizó a temperatura ambiente, entre 19 y 26 °C, según lo registrado en la memoria del termohigrómetro digital Brookstone.

**RESULTADOS**

Los resultados del experimento se presentan en la tabla 1 y la figura 1. Se observó que los granos de kéfir obtenidos a temperatura constante fueron menos consistentes que los de su contraparte a temperatura ambiente.

**Tabla 1.** Efecto de la Temperatura en la obtención de biomasa de granos de kéfir utilizando leche entera como sustrato.

Frascos (Nº)	Tº Constante (24 °C)				Tº Ambiente (19 °C a 26 °C)			
	pH in	pH fi	WBH	WBS	pH in	pH fi	WBH	WBS
1	6,54	3,39	16.5894	1.8449	6,54	3,39	16.4718	1.8455
2	6,54	3,40	16.1461	1.8264	6,54	3,41	15.8254	1.7616
3	6,54	3,40	15.7908	1.7767	6,54	3,39	15.9809	1.7768
4	6,54	3,38	16.6367	1.8308	6,54	3,41	16.1140	1.8195
5	6,54	3,39	16.0227	1.7973	6,54	3,39	16.7359	1.8546
6	6,54	3,38	15.8736	1.7946	6,54	3,40	15.8648	1.7741
Promed.	6,54	3,39	16.1765	1.8118	6.54	3.40	16.1655	1.8054

WBH: Peso de Biomasa Húmeda. WBS: Peso de Biomasa Seca.



**Figura 1.** Granos de Kéfir obtenidos a temperaturas: variable (izquierda) y constante de 24 °C (derecha).

## Evaluación Estadística

Los datos obtenidos en el cuadro 1, donde se destacan valores de pH, peso húmedo y peso seco de biomasa, fueron evaluados estadísticamente mediante la prueba "Chi cuadrado" haciendo uso de *tablas de contingencia*<sup>6</sup>. En los tres casos, el valor obtenido de  $\chi^2$  es menor que el valor de  $\chi^2$  tabulado para 5 grados de libertad y con un nivel de confianza de 95%.

## DISCUSIÓN

A la luz de los resultados obtenidos y de la prueba estadística aplicada se observa que no hay diferencia significativa respecto al peso final de biomasa obtenida, sea esta seca o húmeda. El mismo comportamiento se observa con los valores de pH.

Por otro lado, la mayor consistencia de los granos de kéfir a temperatura ambiente probablemente se deba a la interactividad secuencial de los microorganismos que conforman los granos de kéfir a medida que va variando la temperatura en el tiempo<sup>(1,3)</sup>, esto indicaría que la variación de temperatura favorece la utilización secuencial de metabolitos en el medio de cultivo. Un claro ejemplo es lo que ocurre con la galactosa, azúcar derivado de la hidrólisis de la lactosa, la cual es metabolizada por *Saccharomyces exiguus*, especie especialmente interesante porque se ha demostrado que aun en presencia de glucosa utiliza preferentemente la galactosa como sustrato, por lo que este hecho puede ofrecer cierta ventaja cuando crece en un cultivo mixto de microorganismos, pues la mayoría de los cuales metabolizan preferentemente la fracción de glucosa de la lactosa de la leche<sup>7</sup>. También se sabe que la lactosa es utilizada por bacterias lácticas<sup>8,9,10</sup> y algunas levaduras como *Kluyveromyces marxianus* y *Candida kefir*<sup>11,12</sup>; pero no por *Saccharomyces cerevisiae*<sup>8,13</sup>, levadura que también es componente de la microbiota de los granos de kéfir<sup>14</sup>, por lo tanto, como se puede ver hay una secuencia de utilización de sustratos y metabolitos en la fermentación mencionada, y si se considera que la temperatura óptima de fermentación de las levaduras es muy diferente al de las bacterias, entonces es obvio que la temperatura ambiente, en donde se presentan variaciones de temperatura dados por la hora del día son importantes, pues en determinados momentos, cuando la temperatura es más alta, las bacterias son las favorecidas en su metabolismo, en tanto que cuando la temperatura desciende, las levaduras son más activas.

Para concluir, este estudio demuestra que la producción de biomasa proveniente de la microbiota de los granos de kéfir, sea como subproducto del kéfir o utilizando otros medios de cultivo para su producción, como el suero de leche por ejemplo, en lugares del Perú donde no se registran temperaturas extremas, es viable.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Varnam A H y Sutherland J P. *Leche y Productos Lácteos. Tecnología, Química y Microbiología*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza; 1995. pp. 386, 387.
2. Madigan M T, Martinko J, M y Parker J Brock. *Biología de los Microorganismos*. Octava Edición. Impreso por GRAFILLES (Grupo Frupoin). Madrid; 1997. pp. 162.
3. Brown C M, Campbell I y Priest F G. *Introducción a la Biotecnología*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza; 1989. pp. 7 - 11, 106.
4. Marshall V M y Cole W. "Studies on Kefir" Bulletin of the IDF 179. Dinamarca. 1984.
5. Sasaki Tamaki D. *Elaboración de Kefir. Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias*. Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima ; 1995. pp. 32, 33, 34, 38-40.
6. Calzada Benza J. *Métodos Estadísticos para la Investigación*. Editorial Jurídica S.A. Tercera Edición. Lima; 1970. pp. 208 - 214, 594 - 611, 625.
7. Adams M R y Moss M O. (1997). *Microbiología de los Alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza; 1997. pp. 334 - 336.
8. Robinson R K. *Microbiología Lactológica. Volumen I. Microbiología de la leche*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza; 1987. pp. 48,49,55,56, 57, 62,63,64.
9. Stainer Roger Y, Ingraham John L y Wheelis Mark L et. al. *Microbiología*. 2ª Edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona; 1996. pp. 713.
10. Tortora Gerard J, Funke Berdell R y Case Christne L. *Introducción a la Microbiología*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza; 1993. pp.703, 704.
11. Frazier W C y Westhoff D C. *Microbiología de los Alimentos*. 4ª Edición española. Editorial

- Acribia S.A. Zaragoza; 1993. pp. 45-60; 511-517.
12. **Lodder J.** *General Clasification of the Yeasts. The Yeasts.* 3d. Ed. North – Holland Publishing Co. Amsterdam; 1984.
  13. **Collins C H y Lyne P M.** *Métodos Microbiológicos.* 5ª. Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza; 1989. pp. 417-419, 477, 478.
  14. **Leveau J Y, Bouix M. et. al.** *Microbiología Industrial.* Editorial Acribia S.A. Zaragoza; 2000. pp.304.