



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
LICENCIATURA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

***“DETERMINACIÓN DE LA
ESTABILIDAD DE LAS
PROPIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y
SENSORIALES DEL GRÁNULO
DE KEFIR LIOFILIZADO”***

ANA F. MORETTI

2013

AGRADECIMIENTOS

- A mi directora de tesina, Bqca. Mónica Garré, por haberme dado la posibilidad de realizar parte de mi trabajo en el Instituto Biológico Dr. Tomás Perón.
- A mi co-directora, la Dra. Ángela León (Gela), por su cariño, paciencia infinita, apoyo constante y tiempo.
- A mi tutor, Lic. Raúl Gamba, por su paciencia y ayuda desinteresada.
- Al personal del Instituto Biológico Dr Tomás Perón, especialmente a Florencia, por su tiempo y buena predisposición para ayudarme.
- Al Dr. Tato Cavalitto por su buena predisposición para liofilizar los gránulos.
- A Bibiana del laboratorio de Química Analítica.
- Al personal de la cátedra de Microbiología, FCE-UNLP.
- A mis amigas de la facultad y mis amigas de Lincoln, por haberme acompañado durante estos años.
- A Marian, por su contención y amistad.
- A mis papas y mis hermanos por apoyarme siempre y por estar presentes en cada uno de mis días.
- A Nahuel, por todo su cariño y por estar a mi lado siempre acompañándome.

Capítulo		Pág.
1	Introducción	6
1.1	Definición del kefir	6
1.2	Gránulos de kefir y condiciones tecnológicas de la fermentación	7
1.3	Propiedades antimicrobianas del kefir obtenido con leche y suero fermentados con gránulos de kefir	10
1.4	Conservación de los gránulos de kefir	12
1.4.1	Proceso de liofilización	12
1.4.2	Efecto de la liofilización en los lactobacilos	13
2	Objetivos	15
3	Materiales y Métodos	16
3.1	Incremento de Biomasa del gránulo CIDCA AGK1 (en leche) previo a la liofilización	16
3.2	Liofilización del gránulo de kefir	16
3.3	Activación de los gránulos	17
3.4	Incremento de Biomasa del gránulo CIDCA AGK1 liofilizado (en leche)	17
3.5	Recuento de Bacterias lácticas (BAL) y levaduras (LEV) de los gránulos de kefir CIDCA AGK1 y de la leche fermentada a partir de gránulos frescos y liofilizados	17
3.6	Estudio de la cinética de fermentación de leche con gránulo CIDCA AGK1 fresco y liofilizado	19
3.7	Determinación de la concentración de ácidos orgánicos presentes en la leche fermentada	20
3.8	Análisis de la composición en proteínas, materia grasa y acidez de la leche fermentada con gránulos de kefir liofilizados	20
3.8.1	Determinación de materia grasa por el método de Röse-Gottlieb (Matissek, Schnepel y Steiner, 1998)	20
3.8.2	Determinación de proteínas por el método de Kjeldahl (Matissek, Schnepel y Steiner, 1998)	22
3.8.3	Determinación de acidez titulable con NaOH 0,1 N	23
3.9	Determinación del poder inhibitorio del kefir obtenido a partir de gránulos frescos y gránulos liofilizados almacenados durante 6 meses sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Salmonella sp</i> aislada de un alimento	24
3.9.1	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	24
3.9.2	Determinación cuantitativa de la actividad inhibitoria	25
3.10	Análisis sensorial del kefir elaborado a partir de gránulos CIDCA AGK1 fresco y liofilizado	26
3.10.1	Test de triángulo para determinar similitud	26
3.10.2	Escala hedónica para determinar aceptabilidad	27
3.11	Evaluación estadística	28
4	Resultados	29
4.1	<i>Caracterización del gránulo fresco</i>	29

4.1.1	Estudio de la cinética de fermentación de leche inoculada con gránulo CIDCA AGK1 fresco, al 10% p/v a 20 y 30°C	29
4.1.2	Estudio de la microbiota del kefir obtenido a partir de gránulos frescos	32
4.1.2.1	Recuento a partir de la fermentación de leche UAT con gránulo fresco CIDCA AGK1, en concentración del 10 % p/v y a 20°C	33
4.1.2.2	Recuento a partir de la fermentación en leche del gránulo fresco CIDCA AGK1, en concentración del 10 % p/v y a 30°C	34
4.1.3	Incremento de biomasa del gránulo CIDCA AGK1 (en leche) previo a la liofilización	35
4.2	<i>Caracterización del gránulo liofilizado</i>	37
4.2.1	Cinética de fermentación de la leche con gránulo CIDCA AGK1 liofilizado	37
4.2.1.1	Gránulo liofilizado a t=0, 1, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4°C, inoculado al 10% p/v en leche a 30°C, reactivado por dos pasajes sucesivos en leche	37
4.2.2	Estudio de la microbiota del gránulo liofilizado y del kefir obtenido a partir de leche fermentada con gránulo liofilizado	41
4.2.2.1	Recuento de bacterias ácido lácticas y levaduras a partir del kefir obtenido con gránulo CIDCA AGK1 liofilizado, en concentración del 10 % p/v y a 30°C, a los tiempos 0 y 1, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4°C	41
4.2.2.2	Recuento de bacterias ácido lácticas y levaduras a partir del gránulo liofilizado CIDCA AGK1 a 30°C, a los 3 meses de almacenamiento a 4°C	44
4.2.2.3	Recuento de bacterias ácido lácticas y levaduras a partir del gránulo liofilizado CIDCA AGK1 a 30°C, a los 6 meses de almacenamiento a 4°C	45
4.2.3	Cinética de producción de biomasa del gránulo liofilizado	46
4.2.4	Análisis de la composición físico-química de la leche fermentada con gránulos de kefir liofilizados	47
4.3	Determinación del poder inhibitorio del kefir obtenido a partir de gránulos frescos gránulos liofilizados sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Salmonella sp.</i>	49
4.3.1	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	50
4.3.2	Determinación cuantitativa de la actividad inhibitoria	52
4.4	Determinación de la concentración de ácidos orgánicos presentes en la leche fermentada	55
4.5	Análisis sensorial del kefir elaborado a partir de gránulo CIDCA AGK1 fresco y liofilizado	57
4.5.1	Test de triángulo para determinar similitud	57
4.5.2	Escala hedónica para determinar aceptabilidad	58
4.6	Estudio de la cinética de acidificación, recuento de BAL y LEV y aspecto general del gránulo liofilizado a temperaturas de almacenamiento de 4°C y 37°C	59

4.6.1	Aspecto general del gránulo liofilizado almacenado por 6 meses a 4 °C y a 37°C	59
4.6.2	Cinética de acidificación de la leche con gránulo CIDCA AGK1, liofilizado Almacenado a 4°C y 37°C	61
4.6.3	Recuento de BAL y LEV a partir del gránulo liofilizado CIDCA AGK1 a 30°C, a los 6 meses de almacenamiento a 4°C y 37 °C con activación directa	63
5	Conclusiones	64
6	Perspectivas	66
7	Referencia bibliográfica	67

INDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1. Cinética de fermentación en valores de pH en función del tiempo para el gránulo fresco CIDCA AGK1, al 10%, a 30 °C y 20°C	30
Tabla 2. Recuento de bacterias lácticas (BAL) y levaduras (LEV) de leche fermentada con gránulo fresco CIDCA AGK1 a pH 3,70 y 3,62	33
Tabla 3. Recuento de bacterias lácticas (BAL) y levaduras (LEV) de leche fermentada con gránulo fresco CIDCA AGK1 a pH 3,49 a 30°C	34
Tabla 4. Valores de pH mínimos alcanzados luego de 24 hs de fermentación del gránulo liofilizado CIDCA AGK1 en leche, almacenado a diferentes tiempos a 4°C	39
Tabla 5. Relación entre el tiempo de almacenamiento y el tiempo y pH mínimo alcanzado en la fermentación de la leche con gránulo liofilizado CIDCA AGK1, con diferentes tiempos de almacenamiento a 4°C	39
Tabla 6. Recuento de bacterias lácticas (BAL) y levaduras (LEV), indicadas como UFC/ml de kefir elaborado con gránulo liofilizado almacenado por diferentes tiempos (a 4°C), incubado a 30°C	41
Tabla 7. Recuento de BAL y LEV a partir de gránulo liofilizado CIDCA AGK1 a 30°C, almacenado por 6 meses a 4°C, con reactivación y sin reactivación	45
Tabla 8. Composición físico-química de la leche fermentada a partir de gránulos liofilizados CIDCA AGK1, en concentración del 10%	48
Tabla 9. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Salmonella sp.</i> , obtenida con SLC provenientes de leche fermentada con gránulo CIDCA AGK1 fresco y liofilizado	50
Tabla 10. Recuento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Salmonella sp.</i> (UFC/ml) a diferentes tiempos de incubación, en presencia de SLC de kefir elaborado con gránulos frescos y liofilizados	53
Tabla 11. Valores de ácido láctico y ácido acético (expresados en porcentaje) presentes en el kefir	56
Tabla 12. Cinética de acidificación de leche fermentada con gránulo liofilizado CIDCA AGK1, al 10% y a 30°C, con 6 meses de almacenamiento a 37°C y 4°C	61

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1 Cinética de fermentación: valores de pH en función del tiempo para el gránulo CIDCA AGK1, al 10% p/v, a 30°C y a 20°C	31
Figura 2. Incremento de biomasa: peso de los gránulos frescos CIDCA AGK1 (g) en función del tiempo de incubación (días). Incubados a una concentración del 10% p/v en leche, a 20°C y 30°C	35
Figura 3. Cinética de acidificación de leche fermentada con gránulo liofilizado CIDCA AGK1, al 10%, a 30 °C a diferentes tiempos de almacenamiento a 4°C	38
Figura 4. Recuento de BAL y LEV de kefir elaborado a partir de la incubación a 30°C de gránulos CIDCA AGK1 liofilizados y almacenados a 4°C durante diferentes tiempos	42
Figura 5. Incremento de biomasa: peso de los gránulos liofilizados CIDCA AGK1 (g) en función del tiempo de incubación (días). Incubados a una concentración del 10% p/v en leche, a 30°C	47
Figura 6. Evolución de la concentración de proteínas, materia grasa y acidez en la leche fermentada con gránulo liofilizado CIDCA AGK1, en concentración del 10%, almacenado a 4°C durante diferentes tiempos	48
Figura 7. Cinética de muerte de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y de <i>Salmonella sp.</i> frente a SLC de kefir obtenido con gránulos CIDCA AGK1 frescos y liofilizados	54
Figura 8. Gránulos CIDCA AGK1 liofilizados, almacenados a 4 y 37°C durante 1, 3 y 6 meses	60
Figura 9. Cinética de fermentación: valores de pH en función del tiempo para el gránulo liofilizado CIDCA AGK1, al 10%, a 30°C a diferentes temperaturas de almacenamiento por 6 meses (4 y 37°C)	62

1 INTRODUCCIÓN

El trabajo que se presenta a continuación reúne la investigación realizada dentro del marco de la materia Trabajo Final de la Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la FCE de la UNLP. Este tema se seleccionó con base en los intereses de su autora enfocados al área de la microbiología de alimentos, y de otros conocimientos adquiridos durante las cursadas de la licenciatura, tales como Análisis de Alimentos, Alimentos y Salud, Propiedades Físicas y Químicas de los alimentos I. De otro lado, el tema del trabajo se planteó dentro de una problemática del Proyecto de Extensión de la FCE “Kefir, un alimento probiótico a costo cero”. Se tenía la necesidad de extender el área de trabajo hacia otras regiones del país, encontrándose con la dificultad de enviar los gránulos frescos, es decir, húmedos. Ante la falta de transporte y almacenamiento en el lugar con refrigeración de manera uniforme y continua, se corría el peligro de perder el gránulo almacenado. Por esta razón se pensó en aplicar alguna forma de conservación, en este caso la liofilización, como una opción para el traslado de los mismos, sin importar las distancias y tiempos largos, y que conservara sus características sin necesidad de un transporte especial.

A continuación se presentarán los antecedentes teóricos encontrados a través de la revisión bibliográfica en los cuales se enmarcaron los objetivos del trabajo, las metodologías, la interpretación y conclusiones sobre los resultados obtenidos.

1.1 Definición del kefir

El kefir es una bebida láctea levemente gasificada y viscosa, similar al yogurt, la cual contiene pequeñas cantidades de alcohol y se cree que sus orígenes se remontan a las montañas del Cáucaso en la antigua Unión Soviética (Garrote, 1999). Su consumo se asocia a la longevidad de los habitantes de la región mencionada. Es producido por la fermentación de la leche con una microflora mixta confinada dentro de una matriz llamada “gránulos de kefir”, en donde coexisten en forma simbiótica levaduras y bacterias ácido-lácticas (pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*), responsables de la fermentación ácido-alcohólica (Angulo y col., 1993; Garrote y col., 2001). Cuando se dejan fermentando los gránulos de kefir en la leche, ocurre un pasaje de los microorganismos desde el gránulo hacia la leche, donde continúan multiplicándose

con producción de ácido, y provocando cambios fisicoquímicos y en el flavour (Garrote, 1999).

Según el Art. 576 del capítulo de “Alimentos Lácteos” del Código Alimentario Argentino (CAA), el kefir es uno de los productos que se considera dentro del grupo de leches fermentadas, los cuales se definen como productos, adicionados o no de otras sustancias alimenticias, obtenidos por coagulación y disminución del pH de la leche o leche reconstituida, adicionada o no de otros productos lácteos, por fermentación láctica mediante la acción de cultivos de microorganismos específicos. Estos microorganismos específicos deben ser viables, activos y abundantes en el producto final durante su período de validez. Además, a la definición del kefir se agrega que su fermentación se realiza con cultivos acidolácticos elaborados con gránulos de kefir, *Lactobacillus kefir*, especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*, con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los gránulos están constituidos por levaduras fermentadoras de la lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) y levaduras no fermentadoras de la lactosa (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cereviciae* y *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp* y *Streptococcus salivarius subsp. Termophilus* (CAA, 2010).

Al fermentarse la leche con los gránulos de kefir, se produce una bebida que puede considerarse dentro de la definición de “probiótico”. Según el CAA (Art. 1389), se entiende por probiótico a los microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del consumidor. Para que una cepa pueda ser utilizada como ingrediente probiótico para alimentos deberá cumplir con un protocolo de Evaluación de un Probiótico como ingrediente para Alimentos que se detalla en el artículo 1389 (CAA, 2013).

1.2 Gránulos de kefir y condiciones tecnológicas de la fermentación

Los gránulos o granos de kefir son masas gelatinosas, irregulares, de color blanco o ligeramente amarillento y consistencia elástica. Su tamaño es variable, oscilando desde pocos milímetros a 2-3 cm de diámetro y su forma es semejante al “pochoclo” o a las flores del coliflor (Marshall, 1993).

La FAO/WHO (2001) ha propuesto una definición de kefir basada en la composición microbiológica de los gránulos de kefir y del producto final fermentado, donde, según el

Codex Alimentarius, es un cultivo starter preparado a partir de gránulos de kefir, *Lactobacillus kefir*, y especies del género *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*, creciendo en una relación muy estrecha entre ellos. Los gránulos también contienen levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) y no fermentadoras de lactosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*). Está compuesto por proteínas de la leche (mínimo 2,8% p/p), grasa de la leche (mínimo 10% v/v); posee una acidez titulable expresada como % ácido láctico (mínimo 0,6% v/v) y una concentración determinada de bacterias ácido-lácticas totales (mínimo 10^7 UFC/g) y de levaduras (mínimo 10^4 UFC/g) (FAO/WHO, 2001).

Bottazzi & Bianchi (1980) han estudiado la distribución de los microorganismos en el gránulo de kefir; concluyendo que su lugar en el mismo no es al azar: mientras que los lactobacilos se encontraron generalmente en la periferia, las levaduras se localizaron en el interior.

De acuerdo a su origen, los gránulos poseen diferente composición físico-química. Por ejemplo, aquellos originarios de Bulgaria, Rusia y Yugoslavia están compuestos por aproximadamente 90% de agua, 2-3% de proteínas, 0-3% de lípidos, 5-8% de sustancias solubles no nitrogenadas y 0-7% de cenizas (Otogalli y col., 1973) y se han obtenido valores similares a partir de gránulos de Suecia (Bottazzi y col., 1994). Sin embargo, para el caso de gránulos de kefir CIDCA AGK1 obtenidos de una familia en Argentina, los valores son un tanto diferentes: 83% de agua, 9-10% polisacáridos y 4-5% de proteínas (Abraham & De Antoni, 1999).

Diferentes trabajos han indicado que la microflora de los gránulos del kefir depende principalmente del origen de los mismos (Otogalli y col., 1973; Lin & Kuo, 1999), de las condiciones locales de cultivo (Molska y col., 1983) y de la forma de elaboración y almacenamiento (Zourari & Anifantakis, 1980).

En lo que concierne a los gránulos de kefir de la colección CIDCA, los gránulos de kefir CIDCA AGK1, CIDCA AGK2 y CIDCA AGK4 no presentaron diferencias significativas en la composición microbiológica y química. En cambio, en los gránulos CIDCA AGK3, se encontró una mayor cantidad de proteínas y de levaduras con respecto a los otros tipos de gránulos. También se encontraron diferencias en cuanto a las especies presentes en cada tipo de gránulo. Hay especies que se han encontrado en todos, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter* y *Saccharomyces*. Pero *Leuconostoc mesenteroides* solo se aisló a partir de los gránulos CIDCA AGK1; y lo mismo ocurrió para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar

diacetylactis, *Lactobacillus parakefir* y *Kluyveromyces marxianus*, aislados a partir de los gránulos CIDCA AGK2. La fermentación de todos los gránulos genera productos ácidos, con un pH entre 4,0-3,5. Se obtiene una mayor viscosidad si se inocula la leche con gránulos CIDCA AGK1, con respecto a los gránulos CIDCA AGK4. Se produce un aumento de peso de los gránulos durante la fermentación en leche, sin diferencias significativas entre los gránulos AGK1, AGK2 y AGK3. Pero en los gránulos AGK4, a pesar de ser activos durante la fermentación, no se ve aumentado su peso (Garrote y col., 2001).

El método tradicional para elaborar kefir es por adición de los gránulos kefir, como cultivo starter, a leche pasteurizada y enfriada a 20-25°C. El tiempo de fermentación es de aproximadamente 24 hs, luego se extraen los gránulos por filtración y así queda lista la bebida para su consumo. Los gránulos crecen durante la elaboración del kefir, únicamente a partir de gránulos pre-existentes (Saloff-Coste, 1996).

De acuerdo a la proporción de gránulos que se utiliza para fermentar la leche, se obtienen productos con características diferentes, especialmente el pH final, concentración de lactococos, viscosidad aparente y contenido de CO₂. Al utilizar 100g kefir/l de leche, la velocidad de acidificación es rápida y ocurre un acelerado descenso en la concentración de lactococos, debido probablemente a que este género es muy sensible a valores bajos de pH. En cambio, si se utiliza una concentración de 10 g/l, se evidencia la presencia de una sustancia viscosa. Entonces, si se quiere producir una bebida viscosa y no muy ácida, se debe utilizar la proporción 10 g gránulos/l de leche; en cambio, para obtener un producto ácido, con baja viscosidad y más efervescente, se deben inocular los gránulos de kefir en proporción 100 g/l (Garrote y col., 1998).

Hasta ahora se han empleado los gránulos de kefir CIDCA AGK1 en los comedores del proyecto “Kefir, un alimento probiótico a costo cero” en una concentración del 10% p/v ya que se desea que la fermentación sea rápida, acidificándose rápido el producto y así asegurar que no haya contaminación por microorganismos del ambiente. Esto es muy importante dadas las condiciones precarias de los comedores e instituciones donde se trabaja. Por lo tanto, en este trabajo se ha empleado la inoculación del gránulo de kefir CIDCA AGK1 en leche pasteurizada, en concentración del 10% p/v.

Otras de las características tecnológicas que se estudiaron durante la producción de kefir fue la temperatura de fermentación del sustrato con los gránulos. Londero y col. (2012), utilizaron como sustrato suero de la industria láctea, al cual fermentaron con gránulos

CIDCA AGK10 a 20, 30 y 37 °C. Cuando la fermentación se llevó a cabo a 30 o 37°C, los gránulos cambiaron su apariencia a simple vista, mostraron una menor tasa de crecimiento, bajo contenido de agua, poca diversidad en cuanto a las levaduras presentes y un mayor valor en la relación proteína/polisacárido en comparación con los gránulos fermentados en leche a 20°C. En cambio, en el cultivo a 20 °C y en suero durante tiempos prolongados no se observó variación en la capacidad acidificante, tasa de crecimiento, apariencia macroscópica, ni en la composición microbiológica ni química; sólo se vió reducida la población de ciertas levaduras luego de más de 20 subcultivos en suero.

Aunque en el grupo de Bacterias Lácticas de la FCE de la UNLP, se han estudiado y caracterizado diferentes gránulos de kefir, en el presente trabajo se realizarán todos los ensayos con el gránulo CIDCA AGK1. Su elección se basó en que es el gránulo que se utiliza para trabajar con los comedores que forman parte del proyecto de Extensión “Kefir, un alimento probiótico a costo cero”, de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, dentro del cual se planea la primera aplicación de los resultados.

Una de las propiedades que posee el kefir por ser un alimento probiótico es la de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos. Se han hecho estudios *in vivo* e *in vitro* con resultados muy favorables, frente a bacterias patógenas presentes en alimentos, agua y tierra, además de parásitos intestinales. Algunos resultados obtenidos en estas investigaciones se describen en la siguiente sección.

1.3 Propiedades antimicrobianas del kefir obtenido con leche y suero fermentados con gránulos de kefir

La actividad probiótica del kefir y sus microorganismos aislados ha sido muy estudiada. Entre los efectos que se asocian con su consumo, se pueden nombrar la estimulación del sistema inmune (Thoreux & Schmucker, 2001; Vinderola y col., 2005; Vinderola y col., 2006), inhibición del crecimiento de tumores (Hosono y col., 1990; Murofushi y col., 1983); capacidad antioxidante (Güven y col., 2003); mejoras en los síntomas de los intolerantes a la lactosa (De Vrese y col., 1992; Hertzler & Clancy, 2003) y disminución en los niveles de colesterol (Liu y col., 2006).

También varios autores han demostrado la capacidad antimicrobiana del kefir frente a bacterias patógenas presentes en los alimentos (Ulusoy y col., 2007; Garrote y col., 2000; Cevikbas y col., 1994; Silva y col., 2009). Se estudió el poder de inhibición frente a

Escherichia coli de la leche fermentada con diferentes gránulos de kefir: CIDCA AGK1, CIDCA AGK2, CIDCA AGK3 y CIDCA AGK4 y se pudo establecer que todas los sobrenadantes obtenidos a partir de las leches fermentadas ejercían acción inhibitoria frente a esta bacteria patógena pero sólo los sobrenadantes de AGK1 y AGK2 fueron capaces de detener el crecimiento bacteriano por al menos 25 hs (Garrote y col., 2001).

También ha quedado demostrada la habilidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella* sp. cuando se las incubaba con suero de quesería fermentado con gránulos de kefir en proporción del 10%p/v. También se utilizó como cultivo starter la leche fermentada y el suero fermentado, como opciones a la problemática de tener q producir a nivel industrial grandes cantidades de gránulos. Pero los resultados no fueron los mismos: al tener concentraciones de ácido láctico más bajas, el efecto inhibitorio fue menor (Londero y col., 2011).

Se ha estudiado también el efecto que tiene el sobrenadante de kefir sobre otras bacterias, como *Bacillus cereus*. El sobrenadante de kefir elaborado con gránulos CIDCA AGK1 con un pH= 4, produjo el descenso de 4 log en el recuento de *Bacillus cereus* (estado vegetativo); llegando a la conclusión de que dicha inhibición se debía a la presencia de los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación de la leche (Kakisu y col., 2007).

Los estudios mencionados hasta ahora se refirieron a la capacidad inhibitoria del SLC (sobrenadante libre de células) del kefir frente a ciertas bacterias patógenas. Pero también se ensayó el efecto de los sobrenadantes de kefir sobre otros microorganismos, como por ejemplo el parásito *Giardia intestinalis* (Correa Franco y col., 2013). En dicho trabajo se determinó que la administración regular de kefir a un modelo murino previa a una infección con dicho parásito fue capaz de modificar el curso de la misma, promoviendo así un efecto protector a través de la disminución de trofozoítos (forma vegetativa de los protozoos) activos en el intestino del hospedador.

También se ha investigado el efecto antifúngico de los productos fermentados con gránulos de kefir. Se estudió el efecto de los SLC obtenidos a partir de kefir con gránulos CIDCA AGK1 y CIDCA AGK2 sobre el desarrollo de diferentes cepas de *Aspergillus flavus*. León (2013) obtuvo que el principal efecto antifúngico se daba en el alargamiento de la fase de latencia del hongo, aunque no se vió afectada significativamente la tasa de crecimiento. A menor valor de pH de la leche fermentada y mayor concentración del SLC en el medio de cultivo, el efecto antifúngico fue mayor. También se estableció que los SLC obtenidos a partir de la fermentación de la leche con gránulos CIDCA AGK1 a 30°C,

alcanzando finalmente un pH de 3,3, fueron más efectivos que los obtenidos con sobrenadantes del gránulo CIDCA AGK2 a la misma temperatura y que los obtenidos con sobrenadantes de ambos gránulos a 20 y a 37°C. Se demostró que la acción inhibitoria era proporcional a la concentración de ácidos orgánicos no disociados.

En cuanto a la conservación de los gránulos, previamente se han investigado diferentes métodos, tanto del gránulo como de los microorganismos aislados a partir del mismo tales como la liofilización, refrigeración y congelación.

1.4 Conservación de los gránulos de kefir

Garrote y col. (1997) estudió el uso de la refrigeración como método de preservación de los gránulos y de la leche fermentada a diferentes temperaturas: 4, -20 y -80 °C. Los gránulos almacenados a -20 y -80°C mantuvieron su microbiota y aumentaron su biomasa a una velocidad comparable a la de los gránulos no almacenados. La leche fermentada obtenida a partir de los gránulos almacenados a -20 y -80°C presentó la misma microbiota, y comportamiento reológico, acidez y contenido de dióxido de carbono similares al kefir obtenido por fermentación con gránulos no almacenados. En cambio, los gránulos refrigerados a 4°C no aumentaron su peso y el producto fermentado obtenido no presentó la acidez y viscosidad del producto estándar.

A pesar de que los resultados obtenidos utilizando la refrigeración como medio de conservación fueron muy buenos, sigue prevaleciendo el problema del traslado de los gránulos de manera simple y sin necesidad de un transporte especial. Este problema desaparece en el caso de los gránulos liofilizados.

1.4.1 Proceso de liofilización

La liofilización es un proceso de conservación mediante sublimación utilizado para reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termosensibles. Es el método más adecuado para preservar células, enzimas, vacunas, virus, levaduras, sueros, así como frutas y alimentos en general. Los productos obtenidos no se ven alterados en sus propiedades y se rehidratan fácilmente (Alvarado, 1979; Alvarado, 1996; Ramírez & Cañizares, 2003).

La liofilización no altera la estructura físico-química del material y permite su conservación indefinida sin cadena de frío, con menos del 15% de humedad y alta estabilidad

microbiológica (Alvarado, 1996). Las diferencias que tiene con el secado por calor son que la disminución de tamaño es mínima, el aspecto, el sabor y el aroma no se pierden, se intensifican y se mantienen las características nutricionales (Charm, 1981). El proceso comprende tres etapas: la congelación a bajas temperaturas, el secado por sublimación del hielo del producto congelado, generalmente a muy baja presión, y el almacenamiento del producto seco en condiciones controladas (Ramírez-Navas, 2006).

Se tiene conocimiento de que las membranas son las estructuras más afectadas durante este proceso de deshidratación (Lievence y col. 1994; Castro y col. 1995; Steponkus y col. 1995; Texeira y col. 1997). Este daño es producido por la pérdida de agua en las estructuras mencionadas y en las proteínas, lo cual genera cambios en el estado físico de las membranas lipídicas (Beney & Gervais, 2001) y/o en la estructura de proteínas sensibles (Texeira y col. 1997). Para minimizar y/o evitar estas lesiones, se utilizan habitualmente crioprotectores, sustancias que previenen o reducen la formación de cristales de hielo, evitando de esta manera el daño estructural producido por los cristales. Ejemplos de éstos son los azúcares y proteínas de la leche. Se ha demostrado que el uso de estas sustancias aumenta la tasa de supervivencia de diferentes microorganismos y su efecto es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta durante el proceso de congelado y posterior liofilización (De Antoni y col., 1991; de Urraza & De Antoni, 1997; Carvalho y col., 2004; Blanquet y col., 2005).

1.4.2 Efecto de la liofilización en los lactobacilos

Se ha estudiado el efecto del proceso de liofilización sobre diferentes especies de bacterias y levaduras aisladas a partir de los gránulos de kefir y caracterizadas por Garrote y col. (2001) y Delfederico y col. (2006), entre los que se puede nombrar *Lactococcus lactis* CIDCA 8221, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112. Los resultados obtenidos por Bolla y col. (2010) dieron cuenta que el uso de leche UHT como crioprotector durante la liofilización hizo posible la obtención de altos valores de supervivencia de dichos microorganismos mencionados, en comparación con los valores obtenidos utilizando PBS en lugar de leche. La adición a la leche de trehalosa o sucrosa no produjo aumento en la tasa de supervivencia de los lactobacilos (*Lb. kefir* CIDCA 8348 y *Lb. plantarum* CIDCA 83114), *Lc. lactis* CIDCA 8221 y *Sac. cerevisiae* CIDCA 8112, pero sí tuvo un efecto negativo la presencia de sucrosa (300 mM) sobre *K.*

marxianus CIDCA 8154. También se determinó en ese mismo trabajo que el proceso de liofilización no afectó la capacidad de la mezcla de estos microorganismos, suspendidos en leche, de inhibir el crecimiento de *Shigella sonnei in vitro*; produciendo durante su co-incubación el descenso de la viabilidad de *Shigella* en dos log.

Con base en los estudios anteriores se decidió estudiar el efecto de la liofilización de los gránulos de kefir CIDCA AGK1 (usando leche UAT como crioprotector) sobre las propiedades físico-químicas, microbiológicas y sensoriales del gránulo liofilizado y del kefir preparado a partir de éste.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la estabilidad microbiológica y físico-química y las propiedades antimicrobianas y sensoriales del gránulo de kefir CIDCA AGK1 liofilizado y almacenado durante 6 meses a T° de refrigeración.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la composición microbiológica del gránulo de kefir fresco y liofilizado durante el almacenamiento y de la leche fermentada.
- Establecer las propiedades físico-químicas de composición proteica, materia grasa y acidez de la leche fermentada con gránulo de kefir fresco y liofilizado.
- Establecer la cinética de fermentación de la leche fermentada con gránulo CIDCA AGK1 fresco y liofilizado almacenado hasta seis meses.
- Analizar la composición de ácidos orgánicos (láctico y acético) del kefir fabricado tanto con gránulos frescos como liofilizados.
- Evaluar la capacidad inhibitoria sobre microorganismos ubicuos asociados a ETA's (Enfermedades Transmitidas por Alimentos), del kefir obtenido a partir de gránulos liofilizados y de gránulos frescos.
- Comparar las propiedades sensoriales de la leche fermentada con gránulo fresco y con gránulo liofilizado (con reactivación directa) almacenado durante seis meses a 4 °C.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Incremento de Biomasa del gránulo CIDCA AGK1 (en leche) previo a la liofilización

Se analizó el incremento de biomasa durante repiques sucesivos cada 24 horas de los gránulos CIDCA AGK1 en leche UAT entera homogeneizada, fortificada con vitaminas A y D (Sancor[®], Santa Fe, Argentina), almacenados en cuartos de temperatura a 20 °C y a 30°C. Los gránulos se separaron con un colador de malla de 1 mm² de la leche fermentada. Se lavaron con agua destilada entre cada repique, se secaron levemente con papel adsorbente y se pesaron en una balanza analítica automática PRECISA XB 220^a (Control Técnica Instrumentación Científica, Boadilla, Madrid). Los resultados se expresaron como biomasa en gramos vs tiempo en días. Para todos los ensayos que requirieron el uso de leche, se utilizó la leche UAT entera homogeneizada, fortificada con vitaminas A y D (Sancor[®], Santa Fe, Argentina).

3.2 Liofilización del gránulo de kefir

Para liofilizar se tomó aproximadamente 1 g de gránulo fresco, pesado en balanza OHAUS CS series (OHAUS[®], NJ, USA), el cual se depositó en un frasco ampolla estéril y se lo cubrió con 1 ml de leche UAT. Se los cerró con tapones de algodón. Se congelaron a -20°C durante el primer día y el segundo día a -80°C y se procedió a realizar la liofilización utilizando un liofilizador Rificor modelo L-A-B3 (Rificor[®], Buenos Aires, Argentina), en condiciones de vacío, durante tres días a -39°C. Los frascos ampolla se sellaron en una cabina de flujo laminar, retirando el tapón de algodón y colocando en su lugar una tapa de goma estéril y por encima una tapa metálica con ayuda de una viroladora. Se llevaron a almacenamiento a 4 °C, durante seis meses y se tomaron muestras para realizar los diferentes análisis al día cero y a los meses 1, 3 y 6 de almacenamiento.

3.3 Activación de los gránulos

Para la realización de los diferentes análisis, se activaron los gránulos liofilizados inoculándolos al 10% p/v en leche UAT entera homogeneizada, fortificada con vitaminas A y D (Sancor[®], Santa Fe, Argentina) a 30°C mediante dos pasajes consecutivos de 24 horas.

En algunos ensayos también se realizaron los análisis inoculando directamente el gránulo en la leche al 10% p/v y procediendo a fermentar, a diferencia de los que se activaron por doble pasaje en leche antes de la realización de las cinéticas, recuentos, etc.

3.4 Incremento de Biomasa del gránulo CIDCA AGK1 liofilizado (en leche)

Se analizó el incremento de biomasa durante repiques sucesivos cada 24 horas de los gránulos CIDCA AGK1 liofilizados en leche UAT entera homogeneizada, fortificada con vitaminas A y D (Sancor[®], Santa Fe, Argentina), almacenados en cuartos de temperatura a 30°C. Los gránulos se separaron con un colador de malla de 1 mm² de la leche fermentada. Se lavaron con agua destilada entre cada repique, se secaron levemente con papel adsorbente y se pesaron en una balanza analítica automática PRECISA XB 220^a (Control Técnica Instrumentación Científica, Boadilla, Madrid). Los resultados se expresaron como biomasa en gramos vs tiempo en días.

3.5 Recuento de Bacterias lácticas (BAL) y levaduras (LEV) de los gránulos de kefir CIDCA AGK1 y de la leche fermentada a partir de gránulos frescos y liofilizados

Se analizaron los principales grupos microbianos presentes en el gránulo de kefir y en la leche fermentada, que son las levaduras (LEV) y las bacterias ácido-lácticas (BAL) (Garrote, 1999). Para determinar las poblaciones de microorganismos viables se hicieron primero los homogeneizados de la leche fermentada y del gránulo de kefir. Para ello se disolvieron 10 ml de la leche fermentada en 90 ml de agua de peptona estéril al 0,1% p/v, homogeneizándose. Esta constituyó la dilución 1/10. Para los recuentos de los gránulos de kefir los gránulos tuvieron dos procesos diferentes. Uno fue la activación de éstos mediante dos pasajes sucesivos en leche y otro fue tomar directamente el gránulo liofilizado para hacer el recuento. 1 g de gránulo (ya fuera reactivado en leche o sin

reactivar) se disgregó en 9 ml de agua de peptona estéril al 0,1% p/v, lo cual se consideró la dilución 1/10. A partir de estos homogeneizados se hicieron diluciones seriadas en el agua de peptona descrita hasta la dilución 1/10⁸. Para la determinación de BAL a partir de leche fermentada con gránulo de kefir, se sembraron 100 µl de las diluciones 1/10⁶, 1/10⁷ y 1/10⁸, en superficie y por duplicado en agar MRS (Difco[®], Beauvais, Francia). El recuento de BAL a partir del gránulo de kefir, se hizo sembrando en MRS las diluciones 1/10⁸, 1/10⁷, 1/10⁶, 1/10⁵, 1/10⁴ y 1/10³ para el gránulo sin reactivar y las diluciones 1/10⁷, 1/10⁶ y 1/10⁵ en el caso del gránulo reactivado. Las levaduras en la leche fermentada se cuantificaron sembrando de la misma manera las diluciones 1/10⁵, 1/10⁶ y 1/10⁷ en medio YGC (Biokar Diagnostics[®], Beauvais, Francia). Para los recuentos de LEV a partir del gránulo, se sembraron las siguientes diluciones: 1/10⁷, 1/10⁶, 1/10⁵, 1/10⁴, 1/10³ y 1/10² (gránulo sin reactivar) o 1/10⁶, 1/10⁵ y 1/10⁴ (gránulo reactivado). Las BAL y las LEV se incubaron a 30 °C por 24 a 48 horas. Los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de Colonias por ml de kefir (UFC/ml) o como Unidades Formadoras de Colonias por gramo húmedo de gránulo de kefir (UFC/g) (Garrote, 1999), según corresponda.

A continuación se indica la composición de los medios empleados:

- Agar YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar)

COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN (g/l)
Agar	14,9
Cloramfenicol	0,1
D (+)- glucosa	20,0
Extracto de levadura	5,0

pH final= 6,6 ± 0,2

-Agar MRS (De Man-Rogosa-Sharpe)

COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN (g/l)
Peptona	10,0
Extracto de carne	10,0
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	20,0
Fosfato ácido de dipotasio	2,0
Tween 80	1,0
Citrato ácido de amonio	2,0
Acetato de sodio	5,0
Sulfato de magnesio	0,1
Sulfato de manganeso	0,01
Agar	15,0

pH final= 6,5 ± 0,1

- Agar nutritivo

COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN (g/l)
Extracto de carne	3,0
Peptona	5,0
Agar	15,0

pH final= $6,9 \pm 0,2$

- Solución fisiológica

Se obtiene a partir de la disolución de 0,9 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada, alcanzando una concentración de 0,9% p/v.

- Agua peptonada

COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN (g/l)
Peptona de carne	10,0
Cloruro de sodio	5,0

pH final: $7,2 \pm 0,2$

Los medios de cultivo y el agua de peptona se prepararon en agua destilada y se esterizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.6 Estudio de la cinética de fermentación de leche con gránulo CIDCA AGK1 fresco y liofilizado

Se estudió la cinética de acidificación de la leche fermentada con gránulos de kefir CIDCA AGK1 frescos al 10% p/v, a 30°C y 20°C . También se realizó la cinética de fermentación con gránulos de kefir liofilizados al 10% y a 30°C en los tiempos 0, 1, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4°C . Se tomaron mediciones de pH de la leche inmediatamente después de la inoculación con los gránulos y cada hora durante 24 horas o hasta que se estabilizara el valor de pH. Las cinéticas de fermentación se analizaron mediante curvas de pH vs. Tiempo (horas).

3.7 Determinación de la concentración de ácidos orgánicos presentes en la leche fermentada

Se determinaron los ácidos orgánicos presentes en la leche fermentada a partir de gránulos frescos y de gránulos liofilizados y su concentración mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). La identificación de los ácidos se basó en la comparación de los tiempos de retención con soluciones estándar de ácidos láctico y acético. Se usó una columna de exclusión iónica aminex HPX-87H. La fase móvil fue de ácido Sulfúrico 0,009 N, sistema isocrático, con detector ultravioleta y longitud de onda de 214 nm (Garrote, 1999). A partir de las curvas de calibración construidas con las soluciones estándar de ácidos puros se obtuvieron las concentraciones de ácidos presentes en las muestras analizadas. La curva patrón de ácido láctico (Carlo Erba[®], Val de Redil, Francia) se hizo con las siguientes concentraciones: 0,05%, 0,1%, 0,4%, 0,8%, 1% y 1,4%. La curva patrón de ácido acético (Merck[®], Darmstadt, Alemania) se llevó a cabo utilizando las concentraciones de: 0,0025%, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,07% y 0,15%.

3.8 Análisis de la composición en proteínas, materia grasa y acidez de la leche fermentada con gránulos de kefir liofilizados

Se analizó la composición química de la leche fermentada con gránulo liofilizado, a los tiempos 0, 1, 3 y 6 meses de almacenamiento, siguiendo las siguientes metodologías:

3.8.1 Determinación de materia grasa por el método de Röse-Gottlieb (Matissek, Schnepel y Steiner, 1998)

El glóbulo graso de la leche está conformado de la siguiente forma: las gotitas de grasa están recubiertas por una capa de fosfolípidos, cuyas cadenas laterales no polares se encuentran interaccionando, por medio de fuerzas hidrofóbicas, con las moléculas de ácido graso de los triglicéridos; mientras que las cadenas laterales de los fosfolípidos forman enlace con los grupos polares externos de la doble capa proteica (proteínas de la membrana). Por esta razón la grasa de la leche debe liberarse previa a la extracción propiamente dicha, es decir, escindirse de la capa proteica y separarse, ya sea por medio de la desnaturalización o hidrólisis en medio alcalino o ácido. En este trabajo, se utilizó el

método de Röse-Gottlieb para separar la materia grasa de los fosfolípidos. El fundamento de este método es la eliminación de las proteínas por tratamiento de la leche con amoníaco (hidrólisis alcalina), y posterior extracción de la grasa liberada con solventes orgánicos. Luego de eliminar los solventes por destilación o simplemente aireación, la fracción lipídica se seca y se pesa.

Se tomaron 2 ml (por duplicado) de la muestra, se pesaron y se los pasó a un tubo de ensayo, se adicionó una disolución de NH_3 (Carfi S.A, Buenos Aires, Argentina) en concentración del 25% y se incubó en un baño de agua destilada a 60°C , por 20 minutos. Luego de la digestión, se trasvasó a un tubo de Mojonnier, lavando el tubo de ensayo con 5 ml de alcohol etílico (JT Baker[®], Pennsylvania, Estados Unidos) y recolectando las aguas de lavado en el Mojonnier. Se adicionó 25 ml de éter etílico (JT Baker[®], Pennsylvania, Estados Unidos), se agitó enérgicamente y luego se destapó para eliminar la formación de gas; se realizaron estos tres pasos reiteradamente hasta que disminuyó la emisión de gas. Se adicionaron unas gotas de fenolftaleína para evidenciar la separación de fases y luego se adicionaron 25 ml de éter de petróleo (JT Baker[®], Pennsylvania, Estados Unidos), se agitó y luego se dejó en reposo durante un día. Pasada las 24 hs, se extrajo la fase superior y se colocó en un cristalizador previamente tarado, para así evaporar los restos de éter y conservar la materia grasa adherida en el fondo del cristalizador. Se realizaron luego dos extracciones sucesivas cada 45 minutos con 15 ml de éter etílico y 15 ml de éter de petróleo, extrayendo la fase superior, donde además de otros compuestos se encontraba la grasa. Luego de la evaporación completa del éter (el secado se repite tantas veces como sea necesario hasta que la diferencia de peso sea menor a 1 mg), se pesaron los cristalizadores y por diferencia de peso, se obtuvo el porcentaje de materia grasa:

$$G\% = \frac{m_2 - m_1}{M} \cdot 100$$

Donde: m_1 : masa en g del cristalizador vacío

m_2 : masa en g del cristalizador con la materia grasa tras la evaporación de los solventes

M: peso de la muestra ensayada en g

G%: expresado en g de materia grasa por cada 100 gr de leche fermentada

3.8.2 Determinación de proteínas por el método de Kjeldahl (Matissek, Schnepel y Steiner, 1998)

Este método se basa en el tratamiento oxidativo de la muestra con ácido sulfúrico concentrado en presencia de una mezcla catalizadora: las sales/óxidos metálicos sirven para el transporte de oxígeno nascente y el sulfato potásico sirve para elevar el punto de ebullición. El trióxido de azufre formado se adiciona, como ácido de Lewis, al grupo amino del enlace peptídico (base de Lewis) de la proteína para formar ácido amidosulfónico, el cual se degrada posteriormente a sulfato amónico. A partir de este compuesto se libera el amoníaco por tratamiento alcalino (con NaOH), el cual se transporta por medio de una destilación en corriente de vapor a un erlenmeyer con HCl. Luego, se realiza su titulación con una solución de NaOH. El contenido en proteína de la muestra se calcula teniendo en cuenta el contenido medio en nitrógeno de la proteína en cuestión; en este caso, se utiliza el factor de corrección $F = 6,38$ (para leche y productos lácteos).

Para la digestión se tomaron 5 ml de muestra y se colocaron en dos matraces Kjeldahl, se les adicionó 20 ml de H_2SO_4 al 96% (Merck®, Darmstadt, Alemania), 0,8 g de sulfato de cobre ($CuSO_4$ (J.T.BAKER®, USA)) y 7,0 g de sulfato de potasio (K_2SO_4 (J.T.BAKER®, USA)); ambas sales actúan como catalizadores de la reacción de digestión. También se añadieron trozos pequeños de porcelana para reducir la formación de espuma durante el calentamiento y así evitar la posible pérdida de muestra. Se calentó por 4 hs de acuerdo a un programa de calentamiento que eleva la temperatura hasta 400 °C. Paralelamente, se realizó un blanco, con los mismos reactivos pero en el lugar de la muestra se colocó agua destilada. Al terminar esta digestión se obtuvo el nitrógeno amoniacal (NH_4), proveniente principalmente de las proteínas. A continuación, se adicionó cuidadosamente a cada matraz 80 ml de NaOH al 40% (Merck®, Darmstadt, Alemania), con el matraz inclinado y dejándolo caer por las paredes, sin agitar las fases.

Para la etapa de la destilación se procedió inmediatamente a conectar la boca del matraz a una columna de destilación a fin de recoger el NH_3 volátil en un erlenmeyer con 25 ml de HCl 0,1 N (Merck®, Darmstadt, Alemania). Para ello el matraz se sometió a ebullición y se destiló hasta que se duplicó el volumen en el erlenmeyer. Una vez que finalizó la destilación, se apagó el fuego y se lavó la columna por dentro con agua destilada para no perder muestra.

Por último se realizó la titulación del contenido del erlenmeyer con una solución de NaOH 0,0914 N (Merck®, Darmstadt, Alemania), más el agregado de unas gotas de fenolftaleína para indicar el viraje del pH.

El porcentaje de Nitrógeno total se calculó según la fórmula siguiente:

$$\%N = \frac{(\text{Vol}_{\text{HCl1}} - \text{Vol}_{\text{HCl2}}) \times N_{\text{HCl}} \times 1,4007}{\text{Peso muestra}}$$

N_{HCl} = normalidad del HCl

Vol_{HCl1} = volumen total de HCl en que se recogió el NH_3 volátil (25 ml)

Vol_{HCl2} = volumen de HCl titulado con el NaOH (HCl que no reaccionó con el NH_3).

Dado que el Volumen de NaOH gastado = volumen de HCl del erlenmeyer que no reaccionó con el NH_3 , se calculó el Vol_{HCl2} a partir de la siguiente equivalencia:

$\text{Meq NaOH} = \text{Meq HCl}$ de donde:

$$\text{vol NaOH gastado titulación} \times N_{\text{NaOH}} = \text{vol HCl titulado} \times N_{\text{HCl}}$$

* $\text{Vol}_{\text{HCl1}} - \text{Vol}_{\text{HCl2}}$ = volumen de HCl que reaccionó con el NH_3 (proveniente de las proteínas de la muestra) para dar ion amonio.

La proteína total se calculó multiplicando el Nitrogeno total por el factor 6,38, que se emplea para productos lácteos (Horwitz W., 1970).

La cantidad de proteínas se expresó como g de proteína por cada 100 g de muestra total.

3.8.3 Determinación de acidez titulable con NaOH 0,1 N

Se basa en la titulación ácido-base del ácido láctico (presente mayoritariamente en la leche fermentada) con NaOH, una base fuerte, en presencia de un indicador de pH, generalmente fenolftaleína. Este colorante tiene un rango de viraje de 8,0 (incoloro)-9,8 (rosa); en este caso, se ve como el mismo pasa del incoloro al rosado. Se da por finalizada la titulación cuando se ve aparición de la primera coloración rosa que persiste por 30 segundos.

Se tomó una muestra de kefir de 2 ml, se pesó y luego se le adicionaron 100 ml de agua destilada neutralizada previamente con NaOH 0,1 N (Merck®, Darmstadt, Alemania) y unas gotas de fenolftaleína. A partir de esta solución, se tomaron 10 ml los cuales fueron titulados con una solución de NaOH 0,1 N. La acidez se expresó como g de ácido láctico por cada 100 gr de muestra.

3.9 Determinación del poder inhibitorio del kefir obtenido a partir de gránulos frescos y gránulos liofilizados almacenados durante 6 meses sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella sp* aislada de un alimento

La actividad inhibitoria de sobrenadantes de kefir libres de células (SLC) sobre los microorganismos mencionados se evaluó mediante la Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (C.I.M.) y Determinación cuantitativa de la actividad inhibitoria

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Esta concentración se determina en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. En este trabajo, el antimicrobiano a utilizar será el sobrenadante libre de células (SLC) obtenido a partir del kefir (Cavalieri y col., 2005).

3.9.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

El sobrenadante libre de células (SLC) de la leche fermentada con gránulos de kefir frescos y con gránulos liofilizados almacenados a 4°C (por reactivación directa) se obtuvo mediante centrifugación en ultracentrífuga Eppendorf 5415D (Eppendorf®, Alemania) a 13000 rpm por 15 minutos; y se filtró con filtros estériles de membrana de 0,20 µm (Sartorius®, Madrid, España). Se realizaron diluciones seriadas del sobrenadante en tubos con caldo nutritivo estéril (Biokar Diagnostics®, Beauvais, Francia) hasta completar un volumen de 1ml, ensayándose las siguientes concentraciones de sobrenadante: 60% v/v, 50% v/v, 40% v/v, 30% v/v y 20% v/v. En tubos por duplicado con cada concentración, se inocularon 10 µl del microorganismo ensayado, con una concentración de $1,5 \times 10^8$

UFC/ml (obtenida a partir de la comparación con el patrón de 0,5 Mc Farland), alcanzando en el tubo una concentración final de 1/100 v/v. Se incubaron todos los tubos por 24 hs a 37°C. Una vez finalizada la incubación, se observó crecimiento en cada tubo, indicado por la presencia/ausencia de turbidez. A partir de los tubos donde no se observó crecimiento, se tomó una alícuota con ansa en anillo (calibrada en 10 µl) y se sembró en superficie de ágar nutritivo estéril (Parafarm®, Buenos Aires, Argentina), homogeneizando con perlas de vidrio estériles.

El recuento de la concentración inicial del microorganismo evaluado, se hizo a partir de la solución de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml obtenida mediante comparación con el patrón de Mc Farland, el cual estaba disponible en la Cátedra de Microbiología de la FCE-UNLP. Se hicieron diluciones seriadas (dilución=1/10) con solución fisiológica y se sembraron las diluciones $1/10^7$, $1/10^6$ y $1/10^5$ en placas con ágar nutritivo estéril por duplicado. Las placas se incubaron por 24 hs a 37 °C (tanto para *Salmonella sp* como para *Escherichia coli*).

Se considera que un compuesto antimicrobiano tiene efecto bactericida cuando su presencia inhibe el crecimiento de más del 99,9% del microorganismo ensayado, sin poder recuperarse aunque lo pase a un medio sin la sustancia inhibidora. Para poder considerar que la sustancia a la concentración estudiada tiene efecto bactericida, los recuentos obtenidos de los cultivos inoculados a las 24 horas de incubación deben ser inferiores al 0,1% del recuento del inóculo inicial. Si el recuento es superior al 0,1% del inóculo inicial, el efecto se considera bacteriostático (inhibe el crecimiento del patógeno pero no lo mata) (Quintero Flórez, 2010).

3.9.2 Determinación cuantitativa de la actividad inhibitoria

Se realizó un co-cultivo de cada microorganismo con la CIM de SLC de kefir. Se mezclaron en tubos plásticos de 1,5 ml estériles (Eppendorf®, Alemania), una alícuota del sobrenadante libre de células y caldo nutritivo estéril (Biokar Diagnostics®, Beauvais, Francia).

Se preparó la suspensión de concentración conocida de cada microorganismo de acuerdo al valor 0,5 de la escala de Mc Farland. A partir de esta solución se tomaron 100 µl del

inóculo y se adicionaron a la mezcla de reacción, llevándolo a una concentración final de 1/10 v/v.

Se incubó a 37°C y se realizaron recuentos de bacterias viables a diferentes tiempos de incubación (1, 4, 7, 10 y 24 horas) en medio ágar nutritivo estéril (Parafarm®, Buenos Aires, Argentina) por duplicado. Para la hora 1, se sembraron las diluciones 1/10⁷, 1/10⁶, 1/10⁵ y 1/10⁴; para las horas 4 y 7 (ó 10) de incubación, 1/10⁶, 1/10⁵, 1/10⁴ y 1/10³ y para las 24 hs, 1/10⁴, 1/10³, 1/10² y 1/10¹. Los resultados obtenidos se graficaron como Log UFC/ml vs. Tiempo (Quintero Flórez, 2010).

3.10 Análisis sensorial del kefir elaborado a partir de gránulos CIDCA AGK1 fresco y liofilizado

Para el análisis sensorial del kefir elaborado con gránulos CIDCA AGK1 tanto frescos como liofilizados, las muestras tuvieron un código interno para la investigación:

Kefir fresco: Kf y Kefir liofilizado: Kl. Las pruebas aplicadas fueron las siguientes cuya metodología se detalla.

3.10.1 Test de triángulo para determinar similitud

El objetivo del test fue determinar si los panelistas determinaban diferencia entre las muestras del Kf y Kl. Para la obtención de la leche fermentada se tomaron los gránulos, tanto frescos como liofilizados, y se inocularon en leche en una concentración del 1 %p/v. La incubación se realizó en un cuarto de temperatura a 30°C por 24 hs. El pH alcanzado en el kefir en ambos casos fue de alrededor de 4,14-4,17. A las muestras se les adicionó para endulzarlas 46,7 g de azúcar/l de kefir y 166,7 ml de esencia de vainilla /l de kefir.

El panel sensorial contó con panelistas a los cuales se les presentó de manera separada dos triángulos. Estas tríadas estuvieron conformadas por dos muestras de kefir iguales y una muestra diferente contenidas en vasos plásticos de tamaño chico. Cada vaso con la muestra estuvo codificado por un número al azar de tres dígitos, el cual consta en la planilla del organizador. Entre cada triángulo, el panelista debió ingerir una galletita de agua para así neutralizar el sabor característico del kefir (Hough ,2006).

Se utilizó la siguiente planilla:

Nombre: Nro. Mesa: Usted recibirá un grupo de tres muestras. Dos de estas muestras son idénticas y la otra es diferente. Por favor, marque con un círculo el número de la muestra diferente:		
482	512	799
294	936	830

Los datos fueron analizados a partir de la siguiente ecuación:

$$LS\% = [(1,5 \cdot (x/n) - 0,5) + 1,5 \cdot Z_{\beta} \cdot \sqrt{((n \cdot x - x^2)/n^3)}] \cdot 100, \text{ donde}$$

LS%: límite superior del porcentaje de evaluadores

x: número de respuestas correctas

n: número total de evaluadores

Z_{β} : valor de la curva normal correspondiente a una cola (1,64 para $\beta = 5\%$)

β : probabilidad de decir que son similares cuando en realidad son diferentes (error Tipo II)

α : nivel de significación= probabilidad de decir que son diferentes cuando en realidad no lo son (error Tipo I)

Si el valor de LS% obtenido es menor o igual al valor de Pd fijado (Poder de diferenciación, proporción de evaluadores que son capaces de detectar la diferencia), se concluye que las muestras son similares (Hough, 2006).

3.10.2 Escala hedónica para determinar aceptabilidad

El objetivo de esta prueba fue calificar a las diferentes muestras de acuerdo al nivel de agrado que les producen a los consumidores. Para este fin, se utilizó una escala hedónica.

Se elaboró el kefir con una concentración de gránulos de kefir en leche entera de 1% p/v. A las muestras se les adicionó para endulzarlas 46,7 g de azúcar/l de kefir y 166,7 ml de esencia de vainilla /l de kefir.

Se presentó cada muestra de kefir en un vaso de plástico blanco junto con una planilla de calificación. El método utilizado se basó en la propuesta de Hough (2006), en la cual, los

vasos fueron identificados con un número de tres dígitos, el cual consta en la planilla del organizador. Cada consumidor debió puntuar la muestra de acuerdo a su nivel de agrado, asignando un puntaje del 1 al 10 a cada uno de los componentes de la escala, siendo el 1 “me disgusta muchísimo” y el 10 “me gusta muchísimo” (Hough, 2006). Se utilizó la siguiente planilla:

Nombre: Edad: Ponga un puntaje del 1 al 10 de acuerdo a su nivel de agrado, donde 1 es “me disgusta muchísimo” y 10 es “me gusta muchísimo”

3.11 Evaluación estadística

Los resultados fueron analizados utilizando análisis de varianza. Se empleo el test de Fisher de las mínimas diferencias significativas (LSD) para la comparación de pares (Nivel de Significancia $\alpha=0.05$). Para ello se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XV.I.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL GRÁNULO FRESCO

Los gránulos CIDCA AGK1 frescos, que iban a ser liofilizados, fueron caracterizados en cuanto a sus cinéticas de acidificación, producción de biomasa y composición microbiológica cuando son inoculados al 10% p/v en leche UAT, e incubados a dos temperaturas: 20 y 30 °C. Esto se hizo con varios objetivos:

- Corroborar que sus propiedades se correspondían a las ya referenciadas por otros investigadores del grupo.
- A partir de lo anterior, someter estos gránulos a liofilización.
- Comparar estos resultados con los obtenidos para las mismas propiedades del kefir elaborado con gránulos liofilizados.

A continuación, se describen los resultados obtenidos con el gránulo CIDCA AGK1 fresco.

4.1.1 Estudio de la cinética de fermentación de leche inoculada con gránulo CIDCA AGK1 fresco, al 10% p/v a 20 y 30°C

El gránulo proveniente de almacenamiento a -20 °C, fue reactivado con pasajes sucesivos en leche. La cinética se hizo inoculando el gránulo fresco al 10% p/v en leche y se tomaron medidas de pH hasta que el valor alcanzado llegó a una constante. Se obtuvieron los siguientes datos, presentados en la tabla 1 y graficados en la figura 1.

30°C		20°C	
Tiempo (h)	pH ± DE	Tiempo (h)	pH ± DE
0	6,30±0,14	0	6,39±0,01
1,63	5,90±0,07	0,98	6,12±0,03
2,33	5,61±0,04	1,98	5,89±0,04
3,18	5,22±0,09	2,96	5,71±0,03
4,23	5,01±0,06	3,95	5,58±0,02
5,22	4,32±0,05	4,98	5,48±0,03
6,22	4,16±0,09	5,92	5,37±0,04
7,20	4,08±0,25	6,68	5,30±0,04
12,82	4,02±0,32	13,67	4,09
13,8	3,84±0,29	14,77	4,06
14,84	3,76±0,26	16,10	4,02
15,82	3,71±0,20	17,17	3,96
16,84	3,66±0,18	18,30	3,93
17,78	3,63±0,17	19,75	3,88
18,84	3,60±0,18	20,75	3,86
19,75	3,56±0,16	21,60	3,83
20,78	3,52±0,18	24,50	3,82±0,22
21,64	3,48±0,16	26,36	3,74±0,01
25,11	3,58±0,02	27,32	3,78±0,13
25,85	3,56±0,05	28,37	3,73±0,30
27,23	3,54±0,02	29,38	3,69±0,25
28,23	3,52±0,01	30,50	3,70±0,22
30,00	3,49±0,01	38,07	3,65
		39,20	3,62
		39,95	3,62

TABLA 1. Cinética de fermentación en valores de pH en función del tiempo para el gránulo CIDCA AGK1, al 10%, a 30°C y 20°C.¹

¹Valores promedio y desviación estándar de experimentos por duplicado.

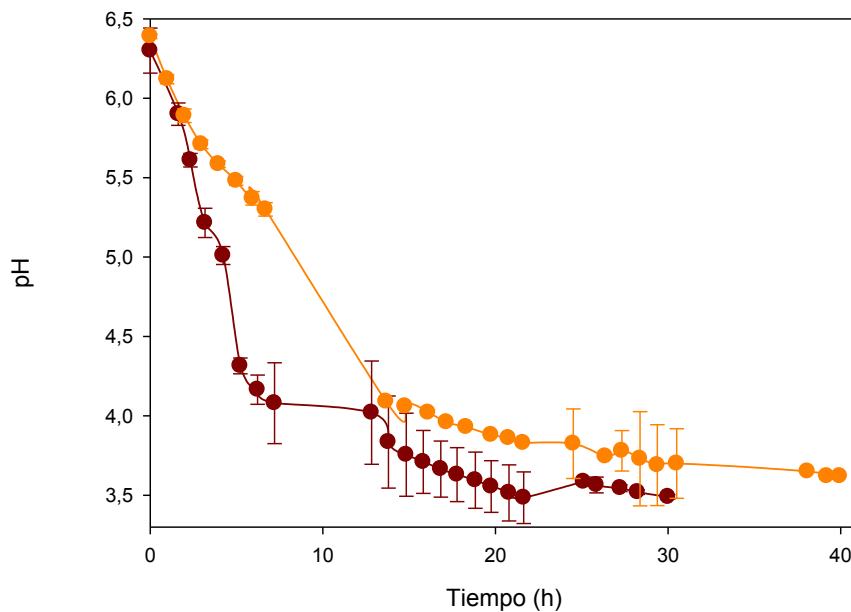


FIGURA 1. Cinética de fermentación: valores de pH en función del tiempo para el gránulo CIDCA AGK1, al 10% p/v, a 30°C y a 20°C. ● Gránulo de kefir CIDCA AGK1 20°C; ● gránulo de kefir CIDCA AGK1 30°C. Las curvas presentan el promedio y DE de los experimentos realizados por triplicado.

En la gráfica se observa una tendencia similar en ambas curvas. Una vez inoculado el gránulo de kefir en la leche, el pH comenzó a descender, por la acción de los microorganismos que pasan del gránulo a la leche y fermentan la lactosa (Garrote, 1999). En relación a la velocidad de disminución del pH, al comienzo de la incubación, ésta es mayor en la leche con gránulo incubada a 30°C con relación a la velocidad a 20°C a las primeras horas de la fermentación, aproximadamente entre la hora 3 y la hora 7. Una vez transcurridas las 15 hs de incubación, las velocidades comenzaron a disminuir hasta llegar a tener pendiente aproximadamente nula. A la hora 30, el kefir alcanzó un pH de $3,49 \pm 0,014$ y $3,70 \pm 0,219$ a 30 °C y 20 °C, respectivamente.

El pH necesario para realizar el ensayo sensorial posterior debía estar cercano a 4,00. Para el caso del gránulo fresco CIDCA AGK1 incubado al 10% p/v a 30°C, este valor se alcanzó a las 6,22 hs aproximadamente. En cambio, este mismo gránulo incubado en las

mismas condiciones pero a 20°C, obtuvo dicho rango de valor luego de las 13 hs de incubación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios descriptos en la introducción, la presencia de ácidos se corresponde con la actividad antimicrobiana y su concentración aumenta a medida que desciende el valor de pH del kefir durante su fermentación. Debido a esto se buscó obtener sobrenadantes de kefir con los menores valores posibles de pH para evaluar su capacidad antimicrobiana. Los sobrenadantes utilizados alcanzaron un pH mínimo alrededor de 3,64. En este caso, el pH fue alcanzado relativamente al mismo tiempo en ambas temperaturas de incubación. Debido a los requerimientos establecidos de pH para análisis sensorial y microbiológico, se decidió fermentar los gránulos liofilizados a 30 °C.

Garrote (1999), determinó que inoculando el gránulo CIDCA AGK1 al 10% en leche e incubando a 20°C, se alcanzaba un pH de 4. Estos resultados son similares a los alcanzados en este estudio ya que a 18 horas de incubación, se alcanzó pH de 4,0. Así, se podría manifestar una marcada similitud entre los datos recopilados en ambos estudios. Partiendo de este análisis se compararán con las cinéticas de los mismos gránulos pero una vez hayan pasado por el proceso de liofilización y reactivación.

Las cinéticas también se compararon con el trabajo de León (2013), en el cual se fermentó el gránulo CIDCA AGK1 fresco al 10 % p/v y 30°C en leche. Se vió que alrededor de las 8 hs de incubación, se obtuvo un valor de pH más bajo en este trabajo (alrededor de 4,00) en relación al reciente mencionado (pH= 4,50 aproximadamente). Pero a las 30 hs de fermentación, los valores de pH encontrados fueron similares, aproximadamente 3,50.

4.1.2 Estudio de la microbiota del kefir obtenido a partir de gránulos frescos

Se realizó el recuento del número total de bacterias lácticas (BAL) y levaduras (LEV) presentes en el kefir, a partir de la inoculación de los gránulos de kefir CIDCA AGK1 frescos en leche fluida, en concentración del 10% p/v e incubados a 20 y a 30 °C.

4.1.2.1 Recuento a partir de la fermentación de leche UAT con gránulo fresco CIDCA AGK1, en concentración del 10 % p/v y a 20°C

La leche se fermentó con gránulos de kefir hasta las horas 30 y 40, alcanzando pH de 3,70 y 3,62 respectivamente. Se realizaron los recuentos de BAL y LEV, según lo descrito en Materiales y métodos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2.

pH final kefir	BAL (UFC/ml) ²	LEV (UFC/ml)
3,70	2,26± 0,22E+8	1,40± 0,40 E+6
3,62	3,08± 0,46E+8	1,35± 0,19 E+6

TABLA 2. Recuento de bacterias lácticas (BAL) y levaduras (LEV) de leche fermentada con gránulo fresco CIDCA AGK1 a pH 3,70 y 3,62, a 20°C¹.

¹ Resultados obtenidos de dos experimentos independientes por duplicado. Se presenta el promedio y la desviación estándar.

²UFC/ml: unidades formadoras de colonias por mililitro de leche fermentada con gránulo CIDCA AGK1 al 10% p/v, a 20°C.

Los recuentos obtenidos fueron similares para ambos pH, indicando que en la región de la curva donde la pendiente es casi nula, sin variaciones grandes de pH, no hubo incremento en el recuento. Aparentemente, los sustratos disminuyeron o existieron metabolitos en el kefir que inhiben a los microorganismos presentes. También se observó esa inhibición en que la producción de ácidos es tan lenta que se refleja en el mínimo descenso de pH.

De acuerdo al CAA, los valores mínimos dentro de los cuales deben estar los recuentos de BAL y de LEV en el kefir deben ser 10^7 y 10^4 , respectivamente (CAA, 2010). En este trabajo se obtuvieron recuentos de un (1) orden de magnitud por encima del valor mínimo de BAL y dos (2) órdenes de magnitud en el caso de las LEV, con lo cual se cumplen los requisitos del CAA.

Al comparar estos resultados con los obtenidos por Garrote (1999) cuando empleó gránulos al 10% e incubó a 20 °C, se observó que las concentraciones encontradas de BAL son similares en ambos ensayos (orden de 10^8 UFC/ml), pero las LEV cuantificadas por Garrote tuvieron aproximadamente un orden de magnitud mayor (10^7 UFC/ml) que el encontrado en este trabajo.

4.1.2.2 Recuento a partir de la fermentación en leche del gránulo fresco CIDCA AGK1, en concentración del 10 % p/v y a 30°C

Para realizar los recuentos se partió de una leche fermentada con gránulos de kefir, los cuales fueron reactivados por sucesivos repiques en leche. En este ensayo, el tiempo de fermentación fue de 30 hs, alcanzando un pH final de 3,49. A partir de la leche fermentada se hicieron las diluciones y las siembras respectivas. Los recuentos obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

pH	BAL (UFC/ml) ²	LEV (UFC/ml)
3,5	0,81±0,08 E+8	2,27±0,65 E+6

TABLA 3. Recuento de bacterias lácticas (BAL) y levaduras (LEV) de leche fermentada con gránulo fresco CIDCA AGK1 a pH 3,49 a 30°C¹.

¹ Resultados obtenidos de un experimento por duplicado. Se presenta el promedio y la desviación estándar obtenida.

² UFC/ml: unidades formadoras de colonias por mililitro de leche fermentada con gránulo CIDCA AGK1 al 10% p/v, a 30°C.

Los recuentos de BAL y LEV obtenidos con leche fermentada a 30 °C, se mantuvieron dentro del límite fijado por el CAA, por lo cual este producto también puede ser empleado en los estudios de liofilización.

Al comparar los valores obtenidos de los recuentos a las dos temperaturas de ensayo por medio de un Análisis de Varianzas (ANAVA), se determinó que los recuentos de BAL presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05\%$); no así en el caso de las LEV: los recuentos a las dos temperaturas ensayadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas. A pesar de estos resultados, se pudo concluir que seguían estando dentro de los valores exigidos por la ley.

Al comparar con los recuentos obtenidos por León (2013), con leche fermentada con gránulo CIDCA AGK1 al 10% en leche UAT, a 30 °C, también a pH 3,5 se observó que las concentraciones tanto de BAL como de LEV fueron de alrededor de un orden de magnitud mayor en el trabajo mencionado ($4,50 \times 10^8$ y $2,25 \times 10^7$ UFC/ml).

Una vez obtenidos los recuentos de las leches fermentadas con los gránulos CIDCA AGK1 a 20 y a 30 °C, se procedió a estudiar el incremento de biomasa de ambos gránulos a diferentes temperaturas, lo cual se desarrolla en el siguiente apartado.

4.1.3 Incremento de biomasa del gránulo CIDCA AGK1 (en leche) previo a la liofilización

Con el fin de analizar si la liofilización influye en la capacidad de producción de biomasa, se compararon las cinéticas de incremento de biomasa del gránulo fresco (sin liofilizar) y liofilizado (**Inciso 4.2.3, pág. 47**). Se realizó el seguimiento del aumento de biomasa del gránulo fresco CIDCA AGK1, incubado al 10% en leche a dos temperaturas: 20 °C y 30°C durante 36 días. Los resultados se expresaron como Biomasa (gramos) vs. tiempo (días), según se observa en la figura 2.

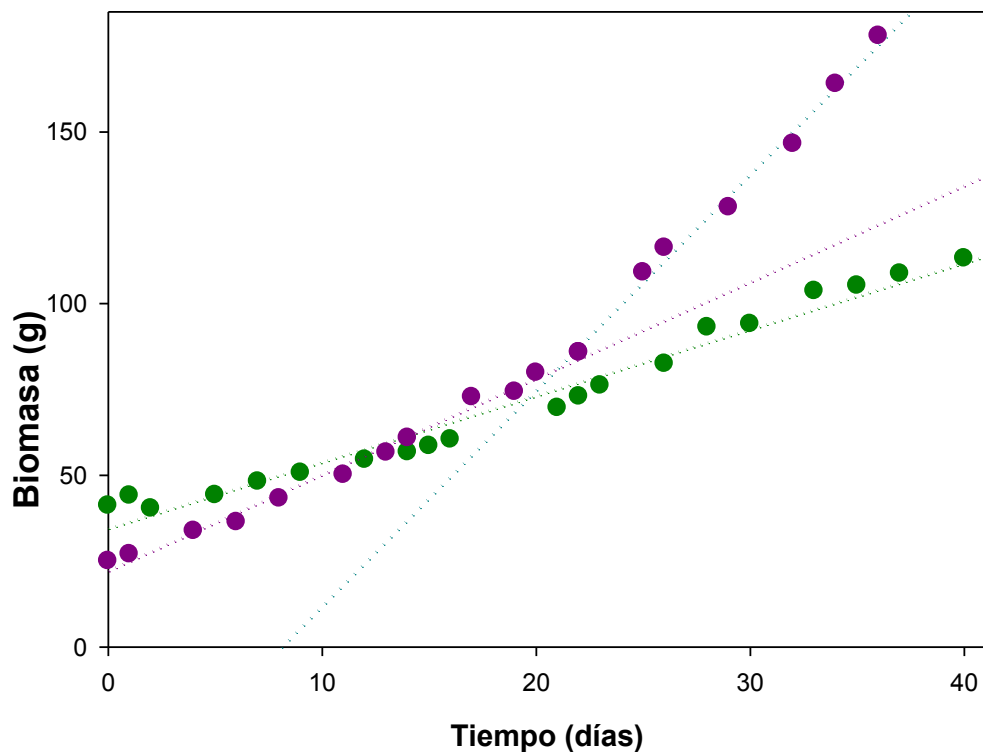


FIGURA 2. Incremento de biomasa: peso de los gránulos frescos CIDCA AGK1 (g) en función del tiempo de incubación (días). Incubados a una concentración del 10% p/v en leche, a 20°C y 30°C. ● Gránulo de kefir CIDCA AGK1 20°C; ● gránulo de kefir CIDCA AGK1 30°C .

En la gráfica se observa que el aumento de biomasa alcanzó mayor velocidad cuando el gránulo fresco fue incubado a 20°C. Además, a partir del día 22 de incubación, se

determinó un cambio en la velocidad de incremento de la biomasa del gránulo almacenado a 20°C, pasando de 2,81 g/día ($r^2=0,9899$) a 6,29 g/día ($r^2=0,9909$). La velocidad del aumento de peso calculada para el gránulo fresco almacenado a 30°C, tuvo un valor constante de 1,93 g/día ($r^2=0,9723$) a lo largo de los días de incubación. Para ambas temperaturas de incubación, la velocidad de aumento de biomasa fue similar durante los primeros 20 días pero a partir del día 22 se hace mucho mayor la velocidad de los gránulos a 20°C. Ya anteriormente se ha demostrado que los gránulos de kefir CIDCA AGK1 crecen bajo sucesivos subcultivos en leche UHT (Garrote, 1999). Según Yokoi y col. (1990), la tasa de crecimiento del gránulo de kefir se define como aumento de peso/ g de gránulo húmedo/día, indicando que la población microbiana del gránulo está activa. Con base en lo anterior se hizo el estudio de incremento de biomasa de los gránulos liofilizados en el tiempo. Así se comparó si los microorganismos seguían viables en el tiempo de almacenamiento, después del tratamiento de conservación. Por otro lado, Abraham y De Antoni (1999) describieron que la proteína del gránulo no venía del sustrato fermentado, por lo cual uno o varios de los microorganismos del gránulo podían ser los responsables de la producción de la proteína y del aumento de biomasa. Es posible que un cambio en la cinética de la biomasa de los gránulos a diferentes tiempos o temperaturas corresponda a un cambio en la población de dichos microorganismos (Abraham y De Antoni, 1999; Garrote, 1999).

Aunque se realizó el ensayo con diferentes cantidades de biomasa iniciales, se pudo observar que el incremento total del peso de gránulos de kefir fue diferente. Luego de 36-37 días de incubación, los gránulos frescos CIDCA AGK1 almacenados a 20°C septuplicaron su peso, mientras que los incubados a 30°C sólo aumentaron aproximadamente 2,5 veces su peso inicial.

Otros investigadores estudiaron el cambio de biomasa del gránulo fresco en suero de lechería a diferentes temperaturas. Cuando la fermentación se llevó a cabo a 30 o 37°C, los gránulos cambiaron su apariencia a simple vista, mostraron una menor tasa de crecimiento, bajo contenido de agua, poca diversidad en cuanto a las levaduras presentes y un mayor valor en la relación proteína/polisacárido en comparación con los gránulos fermentados en leche a 20°C. En cambio, en el cultivo a 20 °C y en suero durante tiempos prolongados no se observó variación en la capacidad acidificante, tasa de crecimiento, apariencia macroscópica, ni en la composición microbiológica ni química; sólo se vió reducida la población de ciertas levaduras luego de más de 20 subcultivos en suero

(Garrote, 1998). Es decir, al igual que lo concluido en esta tesina, la tasa de crecimiento del gránulo depende de la temperatura de fermentación, aunque el sustrato base sea diferente.

Una vez establecidas las propiedades de los gránulos CIDCA AGK1 frescos, se procedió a liofilizarlos tal como se describió en Materiales y métodos. Los gránulos liofilizados se almacenaron a 4°C y se evaluaron sus propiedades microbiológicas, fisicoquímicas, antibacterianas y sensoriales a los tiempos 0, 1, 3 y 6 meses de almacenamiento.

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL GRÁNULO LIOFILIZADO

4.2.1 Cinética de fermentación de la leche con gránulo CIDCA AGK1 liofilizado

4.2.1.1 Gránulo liofilizado a t=0, 1, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4°C, inoculado al 10% p/v en leche a 30°C, reactivado por dos pasajes sucesivos en leche

Se realizó una cinética de fermentación con el gránulo liofilizado inmediatamente luego de liofilizar (tiempo 0) y a los meses 1, 3 y 6 de almacenamiento en heladera (4°C). Para todos los casos, los gránulos fueron reactivados por medio de dos repiques sucesivos en leche. La concentración del gránulo en leche fue del 10% p/v y la temperatura del cuarto de incubación fue de 30°C. Se obtuvieron los siguientes valores de pH en función del tiempo en horas de incubación, los cuales se presentan en la figura 3.

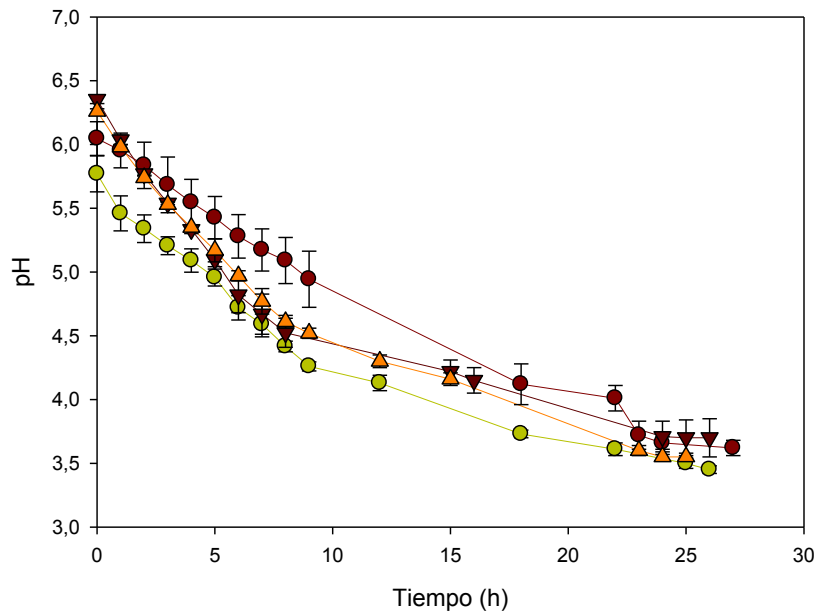


FIGURA 3. Cinética de acidificación de leche fermentada con gránulo liofilizado CIDCA AGK1, al 10%, a 30°C a diferentes tiempos de almacenamiento a 4°C: ● Gránulo liofilizado sin almacenar; ● gránulo almacenado por 1 mes; ▼ gránulo almacenado por 3 meses; ▲ gránulo almacenado por 6 meses¹.

¹ Las curvas presentan el promedio y DE de los experimentos realizados por triplicado.

En la gráfica se observa una tendencia similar en las cuatro curvas. La pendiente de las curvas del gránulo liofilizado sin almacenamiento y del mismo almacenado 1 mes a 4°C fue muy similar, mientras que la obtenida con el gránulo almacenado por 3 y 6 meses a 4°C presentó una pendiente diferente respecto a las dos primeras: fue más pronunciada al comienzo de la cinética.

Esto va de la mano con la relativa estabilidad de las BAL, las cuales son las productoras de ácido láctico, como producto de la fermentación de la lactosa. Este ácido, junto con el ácido acético (producido por las bacterias ácido-acéticas), es el principal responsable de la disminución del pH.

A fin de evaluar si la capacidad de acidificación de las bacterias ácido lácticas presentes en el kefir, fue afectada por la liofilización y el tiempo de almacenamiento, se analizó en la cinética de acidificación de 24 h el mínimo pH que se alcanzaba en dicho tiempo de fermentación. Los resultados se observan en la tabla 4:

Tiempo de almacenamiento (meses)	pH a 24 h fermentación ¹
0	3,66 ± 0,05
1	3,50 ± 0,04
3	3,71 ± 0,13
6	3,55 ± 0,02

TABLA 4. Valores de pH mínimos alcanzados luego de 24 hs de fermentación del gránulo liofilizado CIDCA AGK1 en leche, almacenado a diferentes tiempos a 4°C.

¹Valor de pH alcanzado a las 24 hs de fermentación del gránulo liofilizado a 30°C.

Teniendo en cuenta los valores de pH final de kefir elaborado a partir de los gránulos liofilizados almacenados a distintos tiempos, se estableció que los valores de pH final eran similares, variando entre 3,50 y 3,71.

Se buscó determinar además el tiempo que tardaba cada fermentación en alcanzar un mínimo pH, a partir del cual la curva de acidificación se estabilizaba, lo cual se observa en la tabla 5.

Tiempo almacenamiento a 4°C (meses)	Tiempo fermentación (h)	pH mínimo alcanzado
0	47	3,33 ±0,03
1	29	3,43 ±0,04
3	26	3,70 ±0,02
6	28	3,50 ±0,04

TABLA 5. Relación entre el tiempo de almacenamiento y el tiempo y pH mínimo alcanzado en la fermentación de la leche con gránulo liofilizado CIDCA AGK1, con diferentes tiempos de almacenamiento a 4°C.¹

¹Los valores presentan el promedio y la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado

Se pudo establecer que tanto el tiempo de estabilización de la curva como el mínimo pH al cual tenía lugar, variaba según los distintos meses de almacenamiento. Al tiempo 0, un tiempo de fermentación de casi dos días permitió alcanzar el mínimo pH de todos los tiempos de almacenamiento evaluados, de 3,33. En las fermentaciones realizadas a los demás meses de almacenamiento, no se volvió a descender a este pH, alcanzando valores entre 3,43 y 3,7. Sin embargo, estos valores están dentro de los que se han empleado habitualmente y son recomendados para la fabricación del kefir en los

comedores e instituciones que trabajan con el proyecto de extensión “Kefir un alimento probiótico a costo cero”.

El pH utilizado para realizar el análisis sensorial del kefir posterior debía estar alrededor de 4,00. Este valor fue obtenido a diferentes tiempos aproximados, según las curvas realizadas: 18 hs para el gránulo al tiempo 0 de liofilización; 12 hs para el gránulo liofilizado almacenado por 1 mes a 4°C; 16 hs en caso del gránulo almacenado a la misma temperatura por 3 meses; y 15 hs para el gránulo conservado por 6 meses.

Para el caso del ensayo de actividad antimicrobiana del sobrenadante de kefir, se necesitaba obtener los valores de pH más bajos posibles. Los sobrenadantes utilizados tenían un pH de alrededor de 3,64. Como se puede observar en las tablas y en las curvas, dichos valores de pH fueron alcanzados a diferentes tiempos dependiendo del tiempo que estuvo el gránulo liofilizado almacenado a 4°C. Para el gránulo utilizado inmediatamente luego de liofilizarlo, se alcanzó ese valor de pH aproximadamente a las 27 hs de incubación; para el gránulo liofilizado almacenado a 1 mes a 4°C, 22 hs; para el caso gránulo liofilizado almacenado por 3 meses a 4°C, no se llegó a alcanzar ese valor de pH; el valor mínimo fue 3,7 aproximadamente. Y con el gránulo almacenado por 6 meses a 4°C, llegó al pH de 3,64 a las 23 hs de incubación a 30°C.

Teniendo en cuenta la curva obtenida para el gránulo liofilizado al tiempo 0, y haciendo la comparación con la curva obtenida para el gránulo fresco en las mismas condiciones de temperatura de incubación y de porcentaje de inóculo (30°C y 10% p/v), se pudo observar que el pH tardó más tiempo en estabilizarse para el caso del gránulo liofilizado. La incubación duró aproximadamente 47 hs. Sin embargo, el valor mínimo que alcanzó fue inferior: 3,33. Para el gránulo fresco, el pH llegó a 3,49 luego de 30 hs de incubación a 30°C. Además, de acuerdo a lo visto en las tablas para las primeras horas de incubación, puede decirse que el descenso de pH fue más veloz con el gránulo fresco, que con el gránulo liofilizado.

Al comparar los resultados de la cinética de fermentación del gránulo CIDCA AGK1 liofilizado, con los obtenidos por León (2013) con gránulo fresco CIDCA AGK1, pudo verse la misma relación que en el párrafo anterior. En el trabajo mencionado se alcanzó el pH 4,5 aproximadamente a la hora 8 de fermentación, y tardó 30 horas para llegar al pH de 3,5. A pesar de esto, el tiempo necesario para alcanzar el pH 3,3 fue mayor para el caso del gránulo fresco (60 horas) con respecto al gránulo liofilizado (47 horas).

Los resultados indican que las BAL y las LEV del gránulo de kefir CIDCA AGK1, sobrevivieron tanto a la liofilización como al almacenamiento por meses a temperaturas aproximadas de 4°C, conservando durante todo este tiempo su viabilidad.

4.2.2 Estudio de la microbiota del gránulo liofilizado y del kefir obtenido a partir de leche fermentada con gránulos liofilizados

Se realizó el recuento del número total de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras (LEV) presentes en el kefir, a partir de la inoculación de los gránulos de kefir CIDCA AGK1 liofilizados en leche fluida, en concentración del 10% p/v. También se realizó el recuento a partir del gránulo de kefir liofilizado, con dos reactivaciones sucesivas en leche o sin reactivación previa. Los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de Colonias por ml de kefir (UFC/ml) o como Unidades Formadoras de Colonias por gramo húmedo de gránulo de kefir (UFC/g) (Garrote, 1999), según corresponda.

4.2.2.1 Recuento de bacterias ácido lácticas y levaduras a partir del kefir obtenido con gránulo CIDCA AGK1 liofilizado, en concentración del 10 % p/v y a 30°C, a los tiempos 0 y 1, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4°C

Se tomaron viales del gránulo almacenado en refrigeración al cumplirse los diferentes tiempos de almacenamiento y se hizo la reactivación mediante dos pasajes sucesivos en leche. Seguidamente se realizó la fermentación en leche hasta alcanzar un valor constante de pH y a partir de aquí se hicieron los recuentos según lo especificado en Materiales y métodos. Los recuentos obtenidos se indican en la tabla 6 y en la figura 4.

Tiempo de Almacenamiento	BAL (UFC/ml)	LEV (UFC/ml)
0	2,07 ± 0,21E+8	4,64± 0,38 E+6
1 mes	2,36 ± 1,06 E+8	2,34 ± 0,66 E+6
3 meses	3,12 ± 0,56 E+8	2,29 ± 0,84 E+7
6 meses	2,64 ± 0,20 E+8	1,26 ± 0,47 E+7

TABLA 6. Recuento de bacterias lácticas (BAL) y levaduras (LEV), indicadas como UFC/ml de kefir elaborado con gránulo liofilizado almacenado por diferentes tiempos (a 4°C), incubado a 30°C.¹

¹Valores promedios y desviaciones estándar de los experimentos realizados por triplicado.

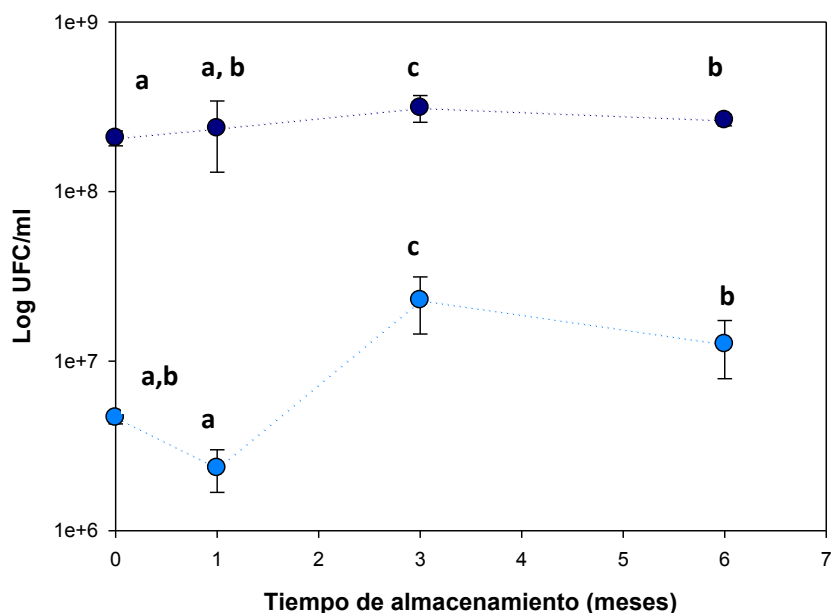


FIGURA 4. Recuento de BAL y LEV de kefir elaborado a partir de la incubación a 30°C de gránulos CIDCA AGK1 liofilizados y almacenados a 4°C durante diferentes tiempos (el eje de las ordenadas está en escala logarítmica). ● Bacterias lácticas (BAL). ● Levaduras (LEV).^{1,2}

¹ Las curvas presentan el promedio y DE de los experimentos realizados por triplicado.

² Los recuentos con la misma letra no tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Como se observa tanto en la tabla 6 como en la figura 4, el recuento de BAL no parece haberse visto influenciado por el almacenamiento prolongado a 4°C, pero al realizar un análisis estadístico se determinó que los recuentos de los meses 0 y 1 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos durante el almacenamiento, al igual que los meses 1 y 6. En cambio, el recuento obtenido a los 3 meses sí presentó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05\%$) respecto al resto de los recuentos.

En el caso de las levaduras, su recuento fluctuó a lo largo del almacenamiento. Se le aplicó un ANAVA a los datos y se determinó que existían diferencias significativas; se realizó un Test de Múltiples Rangos para saber cuáles eran las medias μ que diferían y se encontró que los recuentos obtenidos a los meses 0 y 1 no diferían significativamente. El máximo recuento se alcanzó al mes 3, mientras que disminuyó al mes 6, siendo estadísticamente similar al del mes 0.

En estudios realizados sobre la supervivencia de bacterias ácido lácticas y levaduras, al secado por spray drying, Golowczyc y col. (2010) determinaron que *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 era más estable al tratamiento que la levadura *Saccharomyces lipolytica* CIDCA 8112. Mientras que el recuento del primero descendía alrededor de un logaritmo, el de la levadura descendió entre 2,2 y 4,2 logaritmos, según la temperatura del aire de salida en el equipo de secado (Golowczyc et al., 2010). En nuestro estudio, las levaduras inicialmente descendieron (al mes 1) para luego aumentar su recuento en un logaritmo, (mes 3 y 6), lo cual indicó que aunque hubo un descenso al inicio, la supervivencia en los seis meses de almacenamiento no se vio reducida con este proceso de secado del gránulo.

Los datos encontrados en este trabajo pueden compararse también con la información obtenida por Bolla y col. (2011), con microorganismos liofilizados aislados del gránulo de kefir: *Lactococcus lactis* CIDCA 8221, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112. Se observó que luego de la liofilización del cultivo mixto, y almacenamiento a 4°C por 150 días, la viabilidad de los integrantes del mismo disminuyó aproximadamente dos órdenes de magnitud para el caso de los más afectados (*Lb. plantarum* CIDCA 83114, *Lb. kefir* CIDCA 8348 y *Sac. cerevisiae* CIDCA 8112), siendo los microorganismos menos afectados: *Lc. lactis* CIDCA 8221 y *K. marxianus* CIDCA 8154, los cuales disminuyeron su viabilidad, aproximadamente, en un orden de magnitud.

Se puede concluir que la supervivencia al método de conservación dependería de las condiciones de tratamiento y del microorganismo en particular; por ejemplo, algunas levaduras son más resistentes que otras a un mismo tratamiento de secado.

De acuerdo a lo obtenido, se puede afirmar que los recuentos de bacterias ácido-lácticas permanecen más estables durante el tiempo de almacenamiento luego de la liofilización, que los correspondientes a las levaduras.

Al comparar los valores encontrados para el kefir elaborado con el gránulo de kefir fresco con el del gránulo liofilizado al tiempo cero (0), ambos incubados a 30°C durante la fermentación, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos. A partir de estos resultados se podría decir que el proceso de liofilización no

afecta significativamente la viabilidad y posterior desarrollo de las bacterias lácticas y de las levaduras. Se pudo relacionar también los resultados de este trabajo con los obtenidos por Garrote (1999), donde se determinó la concentración de BAL y LEV en gránulos frescos de kefir CIDCA AGK1 almacenados a 4 °C por 120 días. Se observó que las concentraciones encontradas en ambos trabajos para el número de BAL fueron muy similares; sin embargo, las concentraciones de LEV fueron mayores en este trabajo, incluso hasta dos (2) órdenes de magnitud por encima del valor encontrado en el anterior estudio (Garrote, 1999). A partir de estas observaciones se sigue comprobando que el comportamiento de las levaduras es más variable que el de las bacterias ácido lácticas en los diferentes experimentos.

Al considerar los recuentos mínimos exigidos por el CAA, puede decirse que los dos grupos microbianos resistieron a las condiciones de liofilización y que sus recuentos están dentro de los límites establecidos por la legislación (CAA, 2010).

4.2.2.2 Recuento de bacterias ácido lácticas y levaduras a partir del gránulo liofilizado CIDCA AGK1 a 30°C, a los 3 meses de almacenamiento a 4°C

El gránulo fue reactivado mediante dos pasajes sucesivos de 24 h cada uno, en leche, a una concentración del 10% p/v y se incubó a 30°C. Cumplido el tiempo, se tomó 1 g de gránulo y se disgregó en 9 ml de triptona estéril al 0,1% p/v, lo cual se consideró la dilución 1/10. A partir del homogenizado se hicieron diluciones seriadas hasta la dilución 1/10⁸. Las diluciones se sembraron según lo indicado en Materiales y métodos, tanto para el caso de BAL como de LEV. Se obtuvo un recuento de 2,17±0,09 E+9 UFC/g de BAL y 1,48±0,30E+8 UFC/g de LEV. En este ensayo se observaron también colonias de *Geotrichum candidum* en las placas con medios YGC. Este hongo forma parte de la amplia microflora del kefir (Garrote, 1999).

Se compararon estas concentraciones, por medio de un ANAVA, con las obtenidas a partir de leche fermentada con gránulo liofilizado CIDCA AGK1, a los 3 meses de almacenamiento a 4°C. Este análisis dió como resultado que existían diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de BAL y LEV de los dos tratamientos realizados, a un nivel de confianza del 95%.

4.2.2.3 Recuento de bacterias ácido lácticas y levaduras a partir del gránulo liofilizado CIDCA AGK1 a 30°C, a los 6 meses de almacenamiento a 4°C

Se quiso determinar la diferencia en el recuento obtenido al mayor tiempo de almacenamiento, cuando el gránulo era reactivado por dos pasajes en leche a 30 °C y cuando no era reactivado. Los resultados se expresaron como UFC/g de gránulo liofilizado:

Número de pasajes en leche para reactivación	BAL (UFC/g)	LEV (UFC/g)
0	3,30 ± 0,62 E+5	1,97 ±1,28 E+4
2	2,88 ±0,70 E+8	1,25 ± 0,17E+8

TABLA 7. Recuento de BAL y LEV a partir de gránulo liofilizado CIDCA AGK1 a 30°C, almacenado por 6 meses a 4°C, con reactivación y sin reactivación.¹

¹ Los resultados se obtuvieron de dos experimentos realizados por duplicado.

Los datos presentados en la tabla 7 indican que la diferencia en los valores de UFC/g de gránulo liofilizado según hubiera o no reactivación, estuvo entre 3 y 4 órdenes de magnitud. Igualmente se determinó que los recuentos de BAL y LEV entre los dos tratamientos tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05\%$). Se puede afirmar que es necesario que tenga un pasaje doble por leche para obtener altas concentraciones de bacterias lácticas y de levaduras.

También se compararon estos valores con los obtenidos en el recuento a partir de la leche fermentada con el gránulo liofilizado CIDCA AGK1 (reactivado), almacenado por 6 meses a 4 °C. Se realizó un ANAVA con todos estos datos y se concluyó que, para el caso de las BAL, los recuentos obtenidos a partir de la leche fermentada con el gránulo liofilizado y a partir del gránulo liofilizado reactivado no presentaron diferencias estadísticamente significativas; no así para el caso de la leche fermentada y el gránulo liofilizado sin reactivar previamente ($P<0,05\%$). Se compararon también los recuentos de LEV obtenidos en los tres casos descritos y se determinó que las tres medias de los recuentos tenían diferencias estadísticamente significativas; siendo la de mayor valor la obtenida a partir del gránulo liofilizado y reactivado por doble pasaje en leche, a los 6 meses de almacenamiento. De esta manera, se podría pensar entonces que dentro del gránulo, las concentraciones de BAL y LEV son similares, pero como las bacterias lácticas podrían migrar sin dificultad hacia la leche, no así las levaduras, en el kefir se obtienen concentraciones diferentes de cada tipo de microorganismo. En estudios del gránulo de kefir con microscopio electrónico se ha demostrado que en la periferia del

gránulo se encuentran básicamente las bacterias, y hacia el interior la microbiota cambia progresivamente, aumentando el número de levaduras (Botazzi y Bianchi, 1980; Duitschaever y col. 1988).). No obstante, deberán hacerse investigaciones futuras que analicen más en profundidad la variación del perfil microbiano en el gránulo y en sus productos fermentados.

Los valores obtenidos para el caso de los recuentos de BAL y LEV de los gránulos con los que se fermenta la leche en uno de los comedores que trabaja junto con el Proyecto de Extensión fueron $5,64 \times 10^8$ UFC/g de bacterias lácticas y $7,55 \times 10^7$ UFC/g, para el caso de levaduras.

Garrote (1999) reportó los siguientes valores promedio: $3,96 (\pm 2,92) \times 10^8$ UFC/g lactobacilos y $9,30 (\pm 4,05) \times 10^7$ UFC/g levaduras.

Entonces, la reactivación mínima por dos pasajes sucesivos en leche es necesaria para que la microflora predominante del kefir se encuentre viable, dentro de los parámetros de recuentos exigidos por la legislación y así sea capaz de acidificar la leche.

4.2.3 Cinética de producción de biomasa del gránulo liofilizado

Con el fin de analizar si la liofilización influye en la capacidad de producción de biomasa, se realizó el seguimiento del aumento de biomasa del gránulo liofilizado CIDCA AGK1, incubado al 10% en leche a 30°C durante 22 días. Los resultados se expresaron como Biomasa (gramos) vs. tiempo (días), según se observa en la figura 5.

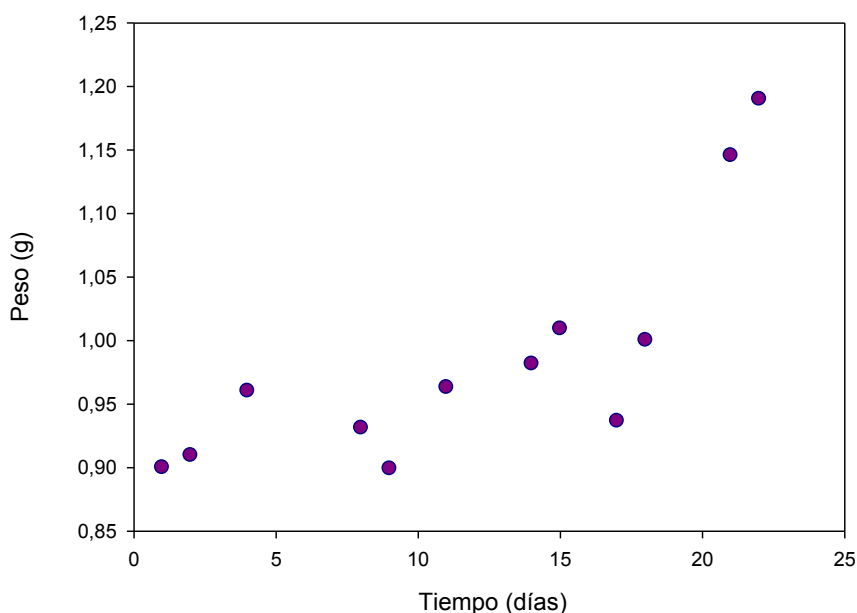


FIGURA 5. Incremento de biomasa: peso de los gránulos liofilizados CIDCA AGK1 (g) en función del tiempo de incubación (días). Incubados a una concentración del 10% p/v en leche, a 30°C.

El gránulo liofilizado almacenado a 4°C durante 6 meses, fue repicado en leche y pesado cada 24 horas, obteniendo una curva que presenta una tendencia ascendente en el aumento de peso. Durante los 22 días del experimento, el gránulo incrementó su peso 1,32 veces. El gránulo fresco al cual también se le estudió la cinética de biomasa a 30°C, aumentó en el mismo período de tiempo 1,77 veces su peso. Lo anterior indica que el gránulo liofilizado pierde capacidad de formación de biomasa con respecto al gránulo fresco. Sin embargo, aunque el gránulo fresco aumenta 1,34 veces más su peso con respecto al liofilizado, se podría considerar que esta no es una gran diferencia. Lo anterior permite pensar que aun cuando desciende la capacidad de formar biomasa, se puede seguir considerando apropiada la liofilización para la conservación y almacenamiento del gránulo.

4.2.4 Análisis de la composición físico-química de la leche fermentada con gránulos de kefir liofilizados

Se realizó el análisis físico-químico de la leche fermentada a partir de la inoculación con gránulos liofilizados CIDCA AGK1, almacenados a 4°C por diferentes tiempos (0,1, 3 y 6 meses). Se realizaron tres determinaciones: materia grasa por el método de Röse-

Gottlieb, proteínas por el método de Kjeldahl y acidez titulable por valoración con NaOH 0,1 N.

Los resultados obtenidos a lo largo de los 6 meses de almacenamiento fueron los siguientes:

TIEMPO (meses)	Proteína (g/100 g)	Materia Grasa (g/100 g)	Acidez (g ac. láctico/100 g)
0	3,35±0,07	3,6±0,24	0,43
1	3,6±0,23	ND	0,49
3	3,95	3,47	0,85
6	3,56±0,09	1,92±0,25	0,74
Valor Referencia ■	MINIMO 2,9	3,0-5,9	0,6-2,0

TABLA 8. Composición físico-química de la leche fermentada a partir de gránulos liofilizados CIDCA AGK1, en concentración del 10%.¹

¹ La determinación de proteínas y de materia grasa se realizó por duplicado. La titulación para precisar acidez se realizó una sola vez.

■ Valores de referencia establecidos según el CAA

ND: No Determinado

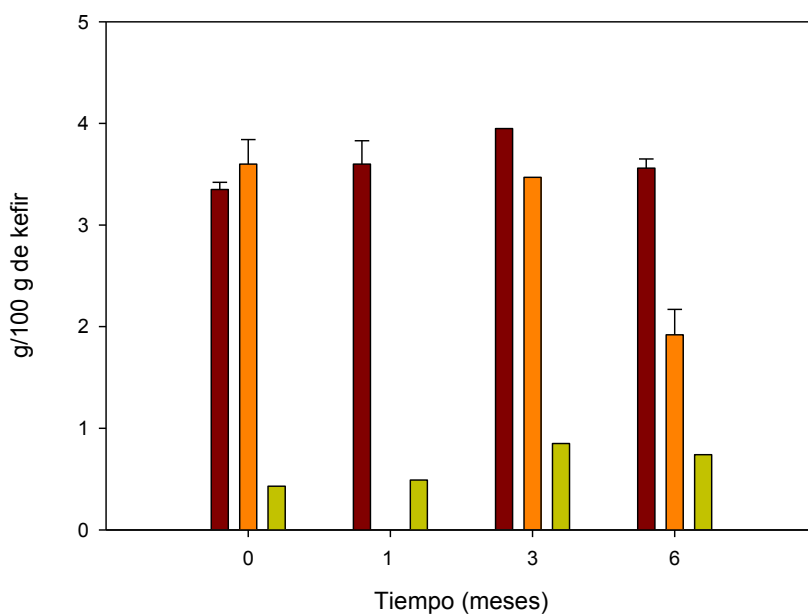


FIGURA 6. Evolución de la concentración de proteínas, materia grasa y acidez en la leche fermentada con gránulo liofilizado CIDCA AGK1, en concentración del 10%, almacenado a 4°C durante diferentes tiempos. ■ g de proteínas/100g leche fermentada; ■ g de materia grasa/100 g leche fermentada; ■ g de ácido láctico/100 g leche fermentada.

Con los datos obtenidos se pudo observar que las concentraciones de proteínas y la acidez son los valores q se mantuvieron relativamente constantes a lo largo del

almacenamiento del gránulo liofilizado. Con respecto a la composición de materia grasa, se pudo decir q hay una disminución en su valor a lo largo del tiempo de almacenamiento. Esta apreciación a simple vista puede complementarse con un análisis estadístico de los datos: en el caso de las proteínas el Análisis de Varianza realizado arrojó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre todos los valores obtenidos durante el tiempo que duró el almacenamiento. El valor de acidez titulable también se analizó estadísticamente y se comprobó que las medias obtenidas durante el mes 0 y el mes 1 no presentaron diferencias estadísticamente significativas, pero sí lo hicieron las medias del mes 3 y 6 de almacenamiento entre ellas y con respecto a las demás. En cuanto al contenido de materia grasa presente en la leche fermentada con los gránulos liofilizados almacenados por diferentes tiempos, se analizó por medio de un ANAVA también y se determinó que los valores se mantenían sin diferencias estadísticamente significativas durante los tres primeros meses de almacenamiento, pero luego de los seis meses de almacenamiento apareció diferencia ($P < 0,05\%$).

Respecto a los valores de referencia establecidos por el CAA (Capítulo VIII, Artículo 576 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006)), la concentración de proteínas siempre se encontró por encima del valor mínimo establecido. Para el caso de materia grasa, el perfil fue variable: en los meses 0 y 3 de almacenamiento, los valores estuvieron dentro del rango de referencia, no así aquel perteneciente al mes 6 de refrigeración: dicho valor quedó por debajo del valor mínimo establecido por el CAA. Si nos referimos a la acidez, se pudo ver que en los meses 3 y 6 de almacenamiento los valores obtenidos se encontraban dentro del rango de referencia, en cambio, en los meses 0 y 1 no se alcanzó el valor mínimo establecido.

4.3 DETERMINACIÓN DEL PODER INHIBITORIO DEL KEFIR OBTENIDO A PARTIR DE GRÁNULOS FRESCOS Y GRÁNULOS LIOFILIZADOS SOBRE *Escherichia coli* ATCC 25922 Y *Salmonella sp.*

La actividad inhibitoria de sobrenadantes de kefir libres de células (SLC) sobre los microorganismos mencionados se evaluó a través de la Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (C.I.M.) y la Determinación Cuantitativa de la actividad inhibitoria.

4.3.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se realizó centrifugando la leche fermentada con gránulo CIDCA AGK1 fresco y liofilizado para obtener el SLC. Se obtuvieron dos SLC a partir de gránulos liofilizados (SN L) y dos SLC a partir de gránulos frescos (SN F). Luego se esterilizaron mediante filtración como se describió en Materiales y métodos y se realizaron las diluciones a ensayar con caldo nutritivo estéril. Por último, se sembró el microorganismo con una concentración estandarizada (0,5 Mc Farland) en relación 1/100 %v/v. Se incubó por 24 hs a 37°C y pasado ese tiempo, se observó la presencia/ausencia de turbidez en los tubos. De los tubos límpidos (sin turbidez) se sembró una alícuota con ansa calibrada en ágar nutritivo estéril; se homogeneizó con perlas estériles, se incubaron las placas a 37°C por 24 hs y se obtuvo el recuento de microorganismos. Relacionando este número de Unidades Formadoras de Colonias obtenidas, con el recuento inicial del microorganismo utilizado para el ensayo de inhibición, se pudo establecer si las concentraciones de SLC ensayadas tuvieron efecto bacteriostático o bactericida sobre el microorganismo. En esta metodología se considera que si el recuento final es menor al 99,9% del recuento inicial, se trata de una concentración bactericida.

La determinación fue realizada con los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella sp.* Se determinó la CIM con SLC obtenidos de leche fermentada con gránulos CIDCA AGK1 frescos y liofilizados adicionados al caldo nutritivo en concentraciones del 20 al 60% v/v. Los datos obtenidos para ambos microorganismos se presentan en la tabla 9:

Concentración de SLC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922					<i>Salmonella sp.</i>				
	60%	50%	40%	30%	20%	60%	50%	40%	30%	20%
F1 ¹ (pH=3,64)	- ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F2 (pH=3,64)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1 (pH= 3,67)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L2 (pH=3,66)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 9. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella sp.*, obtenida con SLC provenientes de leche fermentada con gránulo CIDCA AGK1 fresco y liofilizado.

¹ Los resultados presentados corresponden a duplicados de los SLC obtenidos de leche fermentada con gránulos frescos (F1 y F2) y de los SLC obtenidos de leche fermentada con gránulos liofilizados (L1 y L2). Entre paréntesis se indica el pH de cada SLC.

²(-): tubo con medio límpido: sin crecimiento.

El estudio incluyó los siguientes controles:

- Control de medio de cultivo (a fin de garantizar la esterilidad del medio): tubo con 1,00 ml de caldo nutritivo.
- Control de SLC (a fin de garantizar la esterilidad del SLC): tubo con 0,01 ml de SN F ó SN L+ 1,00 ml de caldo nutritivo.
- Control de cepa (a fin de garantizar la viabilidad del microorganismo): tubo con 0,01 ml de cepa ajustada al 0,5 de Mc Farland+ 1,00 ml de caldo nutritivo.

Los dos primeros controles no mostraron turbidez mientras que el último sí, lo que permitió considerar correctos los resultados de CIM obtenidos.

En el estudio, todos los tubos que dieron resultado negativo (tubos límpidos), se sembraron en placas con ágar nutritivo estéril por 24 hs a 37 °C. Para el caso de *Escherichia coli* ATCC 25922, todas las concentraciones ensayadas fueron BACTERICIDAS. Se puede concluir que la liofilización no afectó la actividad antimicrobiana que posee el kefir. Los SLC a partir de los gránulos CIDCA AGK1 frescos y liofilizados y todas las diluciones analizadas inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, con un 99,9% de probabilidad. Lo anterior se utilizó a continuación para realizar la determinación cuantitativa de la actividad inhibitoria por medio de una cinética llamada curva de muerte.

Se llegó a la conclusión para *Salmonella sp.* que para los SLC liofilizados, todas las concentraciones ensayadas tuvieron efecto bactericida; no así para el caso de los SLC frescos: las concentraciones del 20% v/v tuvieron efecto bacteriostático y las demás concentraciones más altas tuvieron efecto bactericida. Estos datos fueron utilizados luego para realizar la curva de muerte.

Si se comparan estos datos con los obtenidos por Garrote (1999), ensayados mediante spot test con un sobrenadante obtenido por fermentación de la leche al 10% con gránulos frescos CIDCA AGK1 y AGK2, fueron ambos positivos. Los sobrenadantes con rango de pH similar a los ensayados en dicho estudio inhibieron el desarrollo *in vitro* de *Escherichia coli* 3 al 100%. En nuestro estudio se hicieron diluciones del sobrenadante hasta saber

cuál era la dilución mínima que inhibía el desarrollo de *Escherichia coli* ATCC 25922 y también se obtuvieron resultados favorables.

En otras investigaciones (Quintero Flórez, 2010), se obtuvo acción inhibitoria del sobrenadante (pH= 4,01) de tipo bacteriostática sólo a las concentraciones de 60% y 50% v/v, mientras que en este trabajo se evidenció acción bactericida hasta en las diluciones más bajas de los sobrenadantes (20% v/v). En ambos trabajos se usaron los gránulos de kefir CIDCA AGK1 y la misma cepa de *Escherichia coli*. Se podría afirmar que estas diferencias fueron debidas a que los sobrenadantes utilizados tenían diferentes valores de pH, siendo inferiores los usados por nosotros los cuales estaban entre 3,64 y 3,67.

Para *Salmonella spp.*, se encontró efecto inhibitorio *in vitro* también para el caso de *Salmonella spp.* 521, *Salmonella spp.* (poli B9) y *Salmonella no typhi* 18684 (Garrote, 1999)

Estos resultados también coincidieron con los obtenidos con suero fermentado, como sustrato, con gránulos de kefir frescos CIDCA AGK10, donde se demostró la habilidad de inhibir el crecimiento de varios aislados de *E. coli* y *Salmonella sp.* cuando se los co-incubaba con suero de quesería fermentado con gránulos de kefir en proporción del 10%p/v (Londero y col., 2011).

Cabe aclarar que según el Manual de procedimientos del Instituto Malbrán (2001), se ha considerado que a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas, no siempre se obtienen los mismos resultados. Generalmente, la reproducibilidad de esta prueba es de +/- 1 dilución (Ministerio de Salud, 2001).

4.3.2 Determinación cuantitativa de la actividad inhibitoria

Se llevó a cabo mediante una curva de muerte con SLC a partir de gránulos CIDCA AGK1 frescos y liofilizados. Se adicionó a un tubo estéril de 1,5 ml (Eppendorf®, Alemania) el volumen necesario de SLC y de caldo nutritivo estéril para alcanzar la concentración a ensayar de dichos sobrenadantes, según lo indicado en Materiales y métodos. Por último, se agregó una suspensión del microorganismo a ensayar, de concentración estandarizada (0,5 Mc Farland), en relación 1/10 v/v al volumen total de partida. Se llevó a incubar a

37°C y cada determinado tiempo se fueron tomando alícuotas de la mezcla inicial, se hicieron las diluciones correspondientes y se sembró, por duplicado, en placas con ágar nutritivo estéril; estas placas fueron incubadas a 37°C por 24 hs y luego se informó el recuento en términos de UFC/ml.

El recuento inicial de ambos microorganismos se obtuvo por comparación con el patrón de Mc Farland y fue corroborado por recuento en placa, siendo de $8,62 \pm 0,78E+08$ y $1,30E+08$ UFC/ml para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* sp., respectivamente. El inóculo original en caldo nutritivo estuvo un orden por debajo al ser una dilución 1/10 del anterior. En la tabla 12 se reporta el recuento total de cada bacteria correspondiente al recuento con el que inicia la curva de muerte. Para ambos microorganismos se ensayó una concentración del SLC del 20%v/v, obteniéndose los recuentos que se observan en la tabla 10 y las curvas de muerte que se aprecian en la figura 7.

Tiempo (h)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Salmonella</i> sp.	
	SN F (UFC/ml)	SN L (UFC/ml)	SN F (UFC/ml)	SN L (UFC/ml)
0 ¹	$8,62 \pm 0,78E+07$	$8,62 \pm 0,78E+07$	$1,30E+07$	$1,30E+07$
1	$1,68 \pm 0,16E+07$	$1,46 \pm 0,26E+07$	$1,53 \pm 0,13 E+07$	$1,56 \pm 0,71 E+07$
4	$1,28 \pm 0,65E+07$	$1,03 \pm 0,26E+07$	$2,63 \pm 0,19 E+06$	$1,16 \pm 1,21 E+06$
7 ²	$1,30 \pm 0,43E+07$	$1,06 \pm 0,39E+07$	$1,00E+04$	$2,00 \pm 1,41 E+04$
24	$1,93 \pm 1,27E+06$	$1,99 \pm 0,94E+06$	$2,00 \pm 1,41 E+02$	$8,75 \pm 2,47 E+02$

TABLA 10. Recuento de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* sp. (UFC/ml) a diferentes tiempos de incubación, en presencia de SLC de kefir elaborado con gránulos frescos y liofilizados.

SN F: SLC de kefir a partir de gránulos CIDCA AGK1 frescos (pH= 3,64). **SN L:** SLC de kefir a partir de gránulos CIDCA AGK1 liofilizados (pH= 3,67).

Los SLC se ensayaron por duplicado: dos SN L y dos SN F

¹ Concentraciones iniciales del microorganismo a ensayar en la mezcla de reacción.

² Hora 7 para *Escherichia coli* ATCC 25922 y hora 10 para *Salmonella* sp.

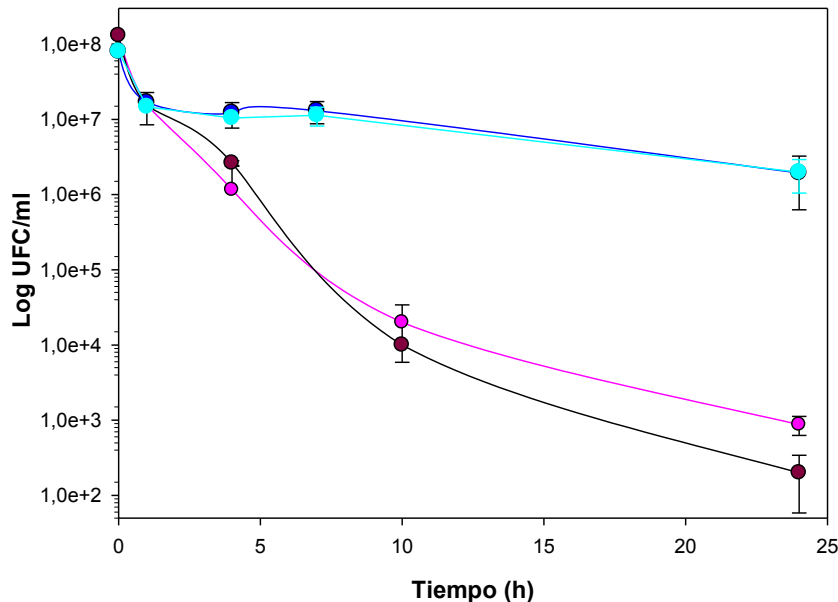


FIGURA 7. Cinética de muerte de *Escherichia coli* ATCC 25922 y de *Salmonella* sp. frente a SLC de kefir obtenido con gránulos CIDCA AGK1 frescos y liofilizados. ● Recuento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en presencia de SN F; ● Recuento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en presencia de SN L; ● Recuento de *Salmonella* sp. en presencia de SN F; ● Recuento de *Salmonella* sp. en presencia de SN L.

Dado que la curva de muerte de *Escherichia coli* ATCC 25922 inició y terminó con un recuento de $8,62 \pm 0,78E+07$ UFC/ml y $1,93 \pm 1,27E+06$ respectivamente, se puede considerar que esta demostró cierta resistencia a la inhibición. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Quintero Flórez (2010), quien realizó el mismo ensayo con *Escherichia coli* EHEC 71935, se pudo ver que en ambos trabajos disminuye el recuento de bacterias viables. No obstante, el descenso fue mayor en el trabajo mencionado, donde el orden de microorganismos descendió de 10^8 a 10^3 UFC/ml aproximadamente en 24 hs. En nuestro trabajo, según se puede observar en la tabla y el gráfico correspondiente, el descenso fue de sólo un (1) orden de magnitud. En contraste con lo anterior, se pudo ver claramente que los SLC obtenidos de la fermentación con el gránulo fresco y con el gránulo liofilizado, fueron efectivos para inhibir el crecimiento de *Salmonella* sp.. La concentración disminuyó en cinco (5) órdenes de magnitud, teniendo en cuenta el efecto de dilución que se produce al realizar la mezcla inicial de incubación.

En coincidencia con esta investigación, otros autores demostraron la capacidad de los SLC de leche fermentada con gránulos frescos CIDCA AGK1 y AGK2 de inhibir, (mediante ensayos de difusión en ágar) el crecimiento de *Escherichia coli* y *E. coli* EHEC, además de *Salmonella* sp., *Shigella sonnei* y *Sh. flexneri*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *St.faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhi* y *Klebsiella pneumoniae*. También adicionaron los SLC en caldo nutritivo con diferentes concentraciones de *E. coli* (10^1 , 10^2 y 10^3 UFC/ml), demostrando el efecto bacteriostático durante 24 horas de incubación a 37 °C (Garrote, 1999; Garrote, Abraham & De Antoni, 2000; Ismaiel, Ghaly & El-Naggar, 2011).

De acuerdo a los resultados obtenidos podría afirmarse que, en general, la liofilización no afectó la acción inhibitoria de los sobrenadantes de kefir sobre los microorganismos patógenos ensayados. Esto constituye otro punto a favor del proceso de liofilización como prolongador de la vida útil del gránulo de kefir CIDCA AGK1.

4.4 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ACIDOS ORGANICOS PRESENTES EN LA LECHE FERMENTADA

Se analizaron mediante HPLC los ácidos presentes en la leche fermentada a 30°C, con gránulos liofilizados CIDCA AGK1 al 10%, los cuales fueron reactivados con un solo pasaje en leche. Estos estuvieron almacenados durante 6 meses a 4 °C y a 37°C.

Los cromatogramas obtenidos para ambos SLC (sobrenadantes libres de células) presentaron como ácidos orgánicos principales el ácido láctico y el ácido acético y las concentraciones determinadas en este estudio así como las halladas en otras investigaciones se exponen en la tabla 11.

COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS AUTORES	pH	Ácido Láctico (%)	Ácido Acético (%)
AGK1 liof, incubado 4°C	4,32	0,65	0,09
AGK1 liof, incubado 37°C	3,46	0,54	0,07
Rea y col. (1996)	-	0,55-0,81	0,02-0,08
Garrote (1999)	-	2,07	0,09
León (2013)	4,50	0,41	0,03

TABLA 11. Valores de ácido láctico y ácido acético (expresados en porcentaje) presentes en el kefir.

La leche fermentada con el gránulo liofilizado almacenado a 4 °C, alcanzó un pH de 4,32. En éste, la concentración de ácido láctico fue de 6534,99 ppm y la de ácido acético fue de 967,1666 ppm, correspondiente al 0,6534% y 0,09672%, respectivamente. La leche fermentada con gránulo liofilizado almacenado a 37°C, alcanzó un pH de 4,46. La concentración de ácido láctico fue 5374,9420 ppm y la de ácido acético 673,2182 ppm, correspondientes a 0,53749% y 0,067321 %, respectivamente. En el presente estudio, se obtuvieron mayores concentraciones de ácidos orgánicos cuando el gránulo liofilizado estuvo almacenado a 4°C en comparación con las obtenidas en el gránulo liofilizado almacenado a 37°C. Estos resultados se relacionan con el hecho de que los microorganismos productores de ácidos orgánicos podrían haber sido perjudicados o dañados de algún modo por la alta temperatura de almacenamiento.

Estos resultados coinciden con los obtenidos para leche fermentada, en las mismas condiciones, mediante gránulos frescos AGK1. En éstos, también se pudo demostrar que los ácidos orgánicos presentes en mayor porcentaje fueron el ácido láctico y el ácido acético. Para el caso de un sobrenadante a pH 4,50, el porcentaje de ácido láctico fue 0,407% y el porcentaje de ácido acético fue 0,030% (León, 2013). Al comparar nuestros resultados con el anterior, pudo observarse que tanto los gránulos almacenados a 4 °C como a 37 °C, produjeron una concentración de ácidos superior a la obtenida con los gránulos frescos en dicho estudio. Por el contrario, según los valores encontrados por Garrote (1999), las concentraciones de dichos ácidos orgánicos encontrados en la leche fermentada con gránulos frescos CIDCA AGK1, al 10%, fueron superiores a los expuestos aquí. Otros investigadores encontraron valores diversos, como el caso de Rea y col. (1996), expuesto en la tabla.

4.5 ANÁLISIS SENSORIAL DEL KEFIR ELABORADO A PARTIR DE GRÁNULO CIDCA AGK1 FRESCO Y LIOFILIZADO

4.5.1 Test de triángulo para determinar similitud

El objetivo del test fue establecer si los panelistas detectaban diferencias entre muestras de kefir elaborado con gránulos CIDCA AGK1 frescos y liofilizados. El panel sensorial estuvo compuesto por 27 panelistas, a los cuales se les presentó de forma separada dos triángulos. Éstos estaban conformados por dos muestras de kefir iguales y una muestra diferente. Hubo un total de 54 triángulos evaluados, de los cuales 23 fueron los diferenciados por los panelistas. Los datos obtenidos fueron evaluados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$LS\% = [(1,5 \cdot (x/n) - 0,5) + 1,5 \cdot Z_{\beta} \cdot \sqrt{((n \cdot x - x^2)/n^3)}] \cdot 100,$$

donde: LS%= límite superior del porcentaje de evaluadores

$$x = 23$$

$$n = 54$$

$$Z_{\beta} = 1,64 \text{ (valor de la curva normal correspondiente a una cola, para un } \beta = 5\%)$$

$$\alpha = 0,1$$

$$\beta = 0,05$$

Pd= 30%= Poder de diferenciación, proporción de evaluadores que son capaces de detectar la diferencia

Reemplazando los parámetros anteriores en la ecuación, se obtuvo un valor de %LS igual a 30%. En ese caso, como %LS fue igual al valor de Pd, es decir, que el límite superior del porcentaje de evaluadores fue igual a la proporción de evaluadores capaces de detectar la diferencia, se pudo decir que no existen diferencias significativas entre ambas muestras, en cuanto a sus características sensoriales generales. En otras palabras, los panelistas no detectaron diferencias entre el kefir fabricado con gránulo fresco y gránulo liofilizado.

Una vez efectuada esta prueba se procedió a evaluar el nivel de aceptación que el kefir podría tener entre un número determinado de consumidores, para lo cual se aplicó el siguiente test.

4.5.2 Escala hedónica para determinar aceptabilidad

El objetivo de esta prueba fue calificar a las muestras de acuerdo al nivel de agrado que les produce a los consumidores. Debido a que a partir del test anterior se concluyó que ambas muestras no tenían diferencias significativas en cuanto a características sensoriales, esta prueba fue realizada con una (1) sola muestra. La muestra utilizada fue kefir elaborado con gránulos frescos CIDCA AGK1, dado que se disponía de gran cantidad de este gránulo en el laboratorio para fabricar todo el kefir necesario, mientras que se disponía de poca cantidad de gránulo liofilizado para el momento de esta prueba. Cabe resaltar que dado que ambos no dieron resultados significativamente diferentes en el test anterior, esta decisión no altera el resultado obtenido.

Participaron 93 panelistas, a los cuales se les presentó el kefir en un vaso de plástico pequeño y una planilla, que se muestra a continuación:

Nombre: Edad: Ponga un puntaje del 1 al 10 de acuerdo a su nivel de agrado, donde 1 es "me disgusta muchísimo" y 10 es "me gusta muchísimo"

Luego de probar la muestra, debieron puntuarla de acuerdo a su nivel de agrado, en una escala del 1 al 10 (del desagrado al agrado). Es importante aclarar que la prueba fue realizada con personas del ámbito de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) que, en su mayoría, no habían consumido nunca kefir. Se realizó un promedio de la calificación otorgada por cada panelista y se obtuvo un valor de 8,76, promediando el resultado obtenido hacia el número entero que está por encima, 9.

Con este resultado se podría decir que, desde el punto de vista sensorial, el kefir elaborado a partir tanto de gránulo CIDCA AGK1 fresco como liofilizado, tiene una amplia aceptación en la población consultada.

4.6 ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE ACIDIFICACIÓN, RECuento DE BAL Y LEV Y ASPECTO GENERAL DEL GRÁNULO A TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO DE 4 Y 37 °C

Dado que en este estudio se hizo todo el almacenamiento a 4°C y con dos pasajes de activación, quisimos hacer una comparación al máximo tiempo de almacenamiento a esta temperatura y a otra extrema como 37°C, y con una reactivación directa (es decir, adicionar la leche al gránulo liofilizado e inmediatamente hacer la fermentación) para establecer si había cambios significativos en las propiedades del gránulo a estas condiciones extremas de almacenamiento y de reactivación. Los resultados se observan a continuación.

4.6.1 Aspecto general del gránulo liofilizado almacenado por 6 meses a 4 °C y a 37°C

En la figura 8 se aprecian las modificaciones a simple vista que sufrieron los gránulos almacenados a 37°C y a 4 °C. Se observa en las fotografías que los gránulos a 4°C mantienen el color crema y su tamaño a través del paso del tiempo, mientras que los gránulos a 37°C van adquiriendo un color tostado a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento y a simple vista se ve una disminución del tamaño.

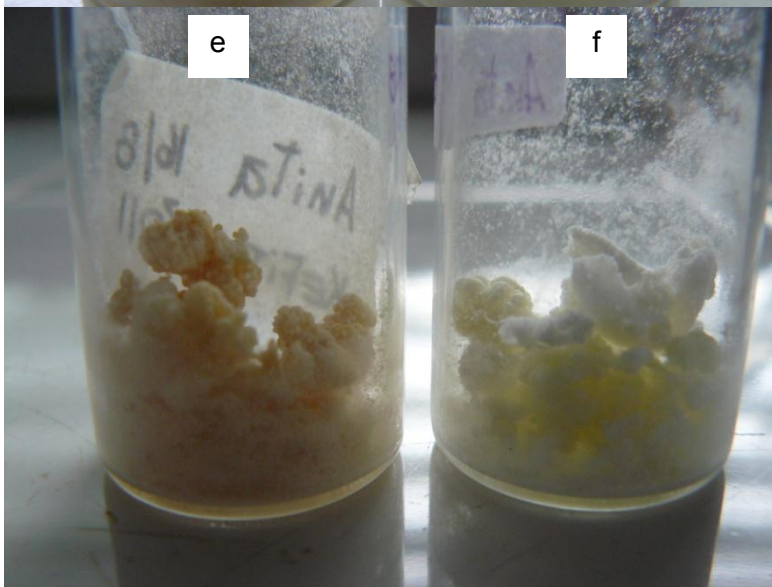
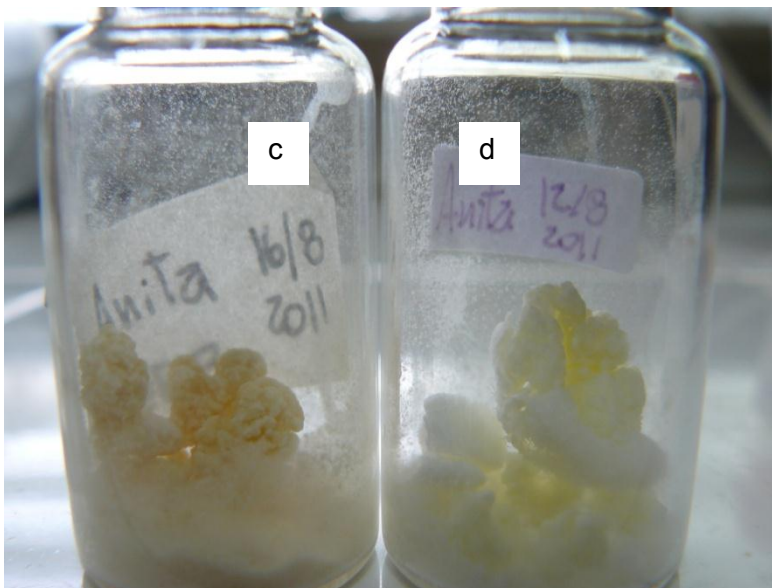
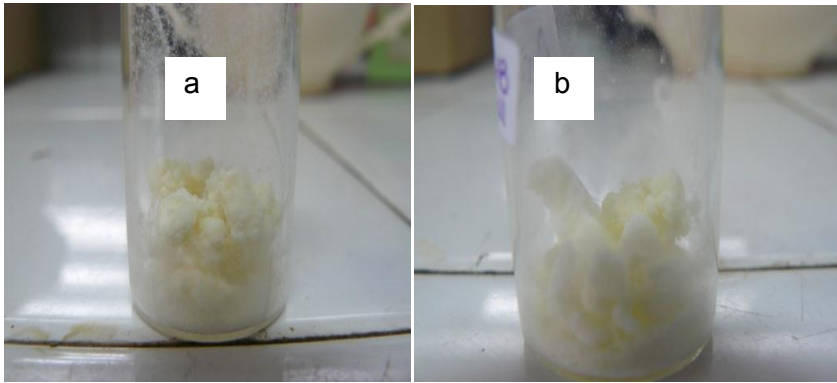


FIGURA 8. Gránulos CIDCA AGK1 liofilizados, almacenados a 4 y 37 °C durante 1, 3 y 6 meses. **a**: gránulo liofilizado almacenado 1 mes a 37°C; **b**: gránulo liofilizado almacenado 1 mes a 4°C; **c**: gránulo liofilizado almacenado 3 meses a 37°C; **d**: gránulo liofilizado almacenado 3 meses a 4°C; **e**: gránulo liofilizado almacenado 6 meses a 37°C; **f**: gránulo liofilizado almacenado 6 meses a 4°C.

4.6.2 Cinética de acidificación de la leche con gránulo CIDCA AGK1, liofilizado Almacenado a 4 y 37°C

Se estudió la cinética de fermentación de la leche fermentada con gránulo liofilizado almacenado por 6 meses a ambas temperaturas de 4°C y 37°C. Se realizó el ensayo adicionando el gránulo al 10% a la leche y comenzando inmediatamente las mediciones. Es decir, no se hicieron dos pasajes de reactivación. La temperatura de incubación de la cinética fue 30°C. Los valores obtenidos de las cinéticas se presentan en la tabla 12.

GRANULO CIDCA AGK1 LIOFILIZADO, 6 MESES ALMACENAMIENTO		
Tiempo (h)	ALMACENAMIENTO A 37 °C	ALMACENAMIENTO A 4°C
	pH	pH
0	6,13	6,23
1	5,98	6,06
2	5,98	6,01
3	5,99	5,95
4	5,99	5,93
5	5,99	5,91
6	5,99	5,9
7	6,01	5,9
22	4,65	4,57
23	4,6	4,5
24	4,55	4,46
25	4,52	4,43
26	4,5	4,41
27	4,48	4,38
28	4,46	4,36
29	4,46	4,33
30	4,46	4,32

TABLA 12. Cinética de acidificación de leche fermentada con gránulo liofilizado CIDCA AGK1, al 10% y a 30°C, con 6 meses de almacenamiento a 37°C y 4°C.

Comparamos primero la cinética obtenida con el gránulo liofilizado almacenado a 4 °C por 6 meses con activación por doble pasaje en leche (descrito en las tablas 4 y 5) y con el mismo a 4°C pero activado directamente (descrito en la tabla 12). En el primer caso, se determinó que a la hora 7 el pH alcanzaba el valor de 4,77; mientras que en el último,

permanecía alrededor de 6. Igualmente, el gránulo que tuvo doble pasaje, alcanzó como mínimo pH 3,5 alrededor de la hora 28, mientras que el otro en 30 horas de incubación sólo llegó a pH 4,32. Aunque este pH puede ser apropiado sensorialmente, se demuestra la necesidad de hacer un doble pasaje de adaptación del gránulo en leche si quiere retomarse una cinética mayor de fermentación y alcanzar un pH apropiado para garantizar actividad antimicrobiana como se vió en el apartado 4.3.

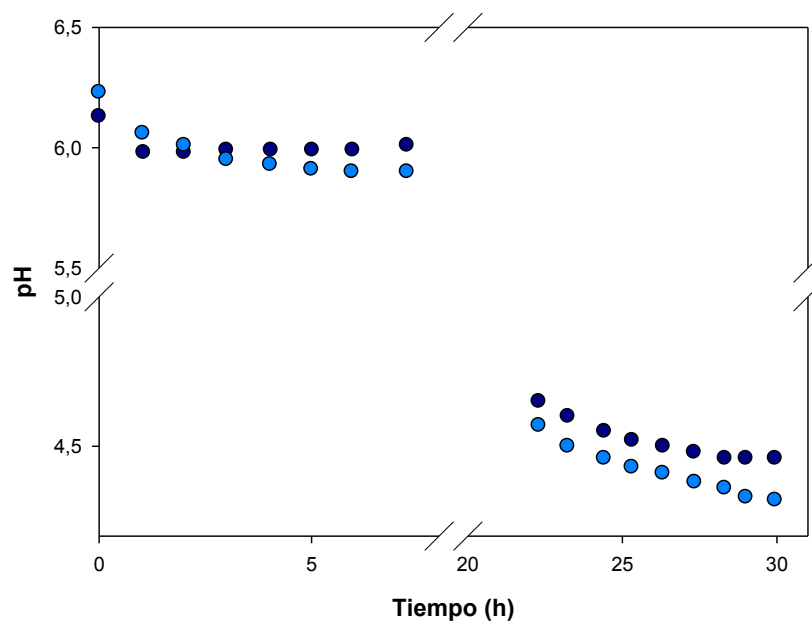


FIGURA 9. Cinética de fermentación: valores de pH en función del tiempo para el gránulo liofilizado CIDCA AGK1, al 10%, a 30°C a diferentes temperaturas de almacenamiento por 6 meses (4 y 37°C). ● Gránulo liofilizado almacenado por 6 meses a 37°C; ● gránulo liofilizado almacenado por 6 meses a 4 °C.¹

¹ Las curvas no presentan DE ya que no se hicieron repeticiones del ensayo. El gránulo que estaba almacenado en estufa a 37°C era una única muestra.

Al comparar las cinéticas de los dos gránulos reactivados directamente y almacenados a 4 y 37 °C, (Tabla 12 y Figura 9), se observa que, en las primeras hs de incubación, el descenso de pH no fue muy importante en ninguno de los dos casos, alcanzando el mismo valor de pH de 6 a la hora 7. Las medidas tomadas a las 22 horas mostraron que aun cuando había descendido el pH, no había logrado llegar ni siquiera a 4,17, pH de

interés para el análisis sensorial. En las horas finales de la cinética, el comportamiento seguido por los gránulos almacenados a las dos temperatura diferentes fue similar, alcanzando un valor de pH más bajo en el caso del gránulo que estuvo almacenado a 4 °C durante 6 meses (4,32). No obstante, ninguno alcanzó ni el valor de pH para el análisis sensorial ni para las pruebas de actividad antimicrobiana. No se observó entonces diferencia entre las cinéticas de ambos gránulos, a pesar de las variaciones macroscópicas como el color y la apariencia general.

Una vez establecidas las cinéticas de fermentación de la leche inoculada con el gránulo de kefir CIDCA AGK1 fresco y liofilizado, se procedió a realizar el recuento de bacterias lácticas (BAL) y levaduras (LEV), en los medios de cultivo correspondientes.

4.6.3 Recuento de BAL y LEV a partir del gránulo liofilizado CIDCA AGK1 a 30°C, a los 6 meses de almacenamiento a 4°C y 37 °C con activación directa

Para los gránulos almacenados a 37 °C, los recuentos del producto fermentado a pH 4,46, dieron $5,65 \pm 0,78 \times 10^8$ UFC/ml de BAL. Sin embargo, no se obtuvo recuento de levaduras, en los medios de cultivo. Es posible que las condiciones de almacenamiento a esta temperatura fueran desfavorables para su supervivencia. No obstante, la fermentación tuvo lugar, dado la presencia de BAL.

En el caso de los gránulos almacenados a 4°C, los recuentos del producto fermentado a pH 4,32 fueron de $8,00 \pm 4,24 \times 10^8$ UFC/ml de BAL y $2,2 \times 10^7$ UFC/ml de LEV, estando en el mismo orden de los recuentos obtenidos con el gránulo activado por dos pasajes. Lo anterior indica que aun cuando se mantiene el orden del recuento de las bacterias y levaduras, el menor descenso de pH pudo deberse a que aun no están totalmente activas o que algunas especies de lactobacilos acidificantes quedaron injuriadas durante el almacenamiento. Para saber esto con más detalle, deberán hacerse estudios a futuro sobre la variación de los diferentes lactobacilos y levaduras del granulo liofilizado y del producto fermentado con él.

5 CONCLUSIONES

En cuanto a la composición microbiológica del gránulo, se puede decir:

- *Las bacterias lácticas y las levaduras del gránulo de kefir CIDCA AGK1, sobrevivieron no sólo al proceso de liofilización, sino también al almacenamiento por 6 meses a temperaturas de 4°C, conservando su viabilidad.*
- *En los productos fermentados con gránulos liofilizados, a los 6 meses de almacenamiento a 4°C, se mantiene el orden del recuento de las bacterias y levaduras dentro de lo reportado para el producto obtenido con gránulo fresco.*
- *La reactivación del gránulo liofilizado mediante dos pasajes en leche, es necesaria para que la microflora predominante del kefir se encuentre viable, dentro de los parámetros de recuentos exigidos por la legislación.*

En cuanto a la cinética de fermentación:

- *Los microorganismos presentes en los gránulos de kefir CIDCA AGK1 liofilizados conservaron su capacidad de fermentar y producir ácidos en la leche, siendo preponderantes los ácidos láctico y acético.*
- *En el producto liofilizado, el pH desciende un poco menos a los 6 meses de almacenamiento que en los meses anteriores.*

En cuanto a la composición físico-química estudiada:

- *La composición de proteínas estuvo siempre por encima del mínimo exigido por el CAA.*

- La composición en materia grasa estuvo dentro del rango establecido por la legislación en los meses 0 y 3, pero en el mes 6 se encontró por debajo del mínimo permitido.

- La acidez titulable alcanzó los mínimos valores exigidos por la legislación a partir de los 3 meses de almacenamiento a 4°C.

En lo referente a actividad inhibitoria:

- La liofilización no afectó la acción inhibitoria de los sobrenadantes de kefir sobre Escherichia coli ni Salmonella sp. Los SLC liofilizados tuvieron una CIM baja (20%) y redujeron la población de ambos microorganismos, siendo superior el efecto obtenido sobre Salmonella sp.

En cuanto al ensayo sensorial:

- No existe diferencia detectable a nivel sensorial entre el kefir fabricado con gránulos frescos y liofilizados.

- Desde el punto de vista sensorial, el kefir elaborado a partir de gránulo CIDCA AGK1 fresco y liofilizado, obtuvo una amplia aceptación en la prueba de aceptabilidad sensorial.

6 PERSPECTIVAS

A fin de conocer más en detalle las condiciones que afectan la cinética de acidificación del kefir, deberán hacerse estudios a futuro sobre la variación de los diferentes lactobacilos y levaduras que conforman en granulo liofilizado y del producto fermentado con él.

También se tiene como meta a futuro ampliar la evaluación de la capacidad inhibitoria. Para esto deberán hacerse estudios de inhibición con SLC obtenidos de gránulos liofilizados sobre microorganismos Gram (+) como *Staphylococcus aureus*, y contra hongos toxicogénicos como *Aspergillus*, *Penicillium* y otros.

Con toda la información recopilada en esta tesina se pretende incorporar, a futuro y luego de profundizar la investigación, el gránulo de kefir liofilizado CIDCA AGK1 al Proyecto de Extensión, como una gran posibilidad de extender el área de trabajo del proyecto hacia otras regiones de la Argentina y del mundo.

7 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1- Abraham, A. & De Antoni, G. L. (1999). Characterization of kefir grains in cows' milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research* **66**, 327-333.
- 2- Alvarado, J. de D. (1979). Ensayos de Almacenamiento y estudio de un Mecanismo de Secado a temperaturas Bajas en Papa (*Solanum tuberosum*). Tesis para optar por el título de Magister Scientifcae. CESNA-INCAP. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 68 p. y anexos
- 3- Alvarado, J. de D. (1996). Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos. Ed. Radio Comunicaciones OEA, Quito, Ecuador.
- 4- Angulo, L., Lopez, E. & Lema, C. (1993) Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain). *Journal of Dairy Research* **60**, 263-267.
- 5- Beney, L. & Gervais, P. (2001). Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**, 34-42.
- 6- Blanquet, S., Garrait, G., Beyssac, E., Parrier, C., Denis, S., Hébrard, G. & Alric, M. (2005). Effects of cryoprotectants on the viability and activity of freeze-dried recombinant yeast as novel oral drug delivery systems assessed by an artificial system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **61**, 32-39.
- 7- Bolla, P., Serradell, M., de Urza, P. & De Antoni, G. (2011). Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiótico properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research* **78**, 15-22.
- 8- Bottazzi, V. & Bianchi, F. (1980). A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granulate. *Journal of Applied Bacteriology*. **48**, 265-268.
- 9- Bottazzi, V., Zacconi, C., Sarra, P. G., Dallavalle, P. & Parisi, M. G. (1994). Kefir. Microbiologia, chimica e tecnologia. *L' Industria del latte* **30** (1) 41-62.
- 10- Carvalho, A., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. & Gibbs, P. (2004). Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Biotechnology Progress* **20**, 248-254.
- 11- Castro, H.P., Texeira, P.M. & Kirby, R. (1995). Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**, 172-176.

- 12- Cavalieri, S., Rankin, I., Harbeck, R., Sautter, R., McCarter, Y., Sharp, S., Ortez, J. & Spiegel, C. (2005). Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. 242 p.
- 13- Cevikbas, A. E., Yemni, E., Ezzedenn, F.W., Yardimici, T., Cevikbas, U. & Stohs, S. J. (1994). Antitumoral antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytotherapy Research* **8**, 78-82.
- 14- Charm, S.E. (1981). The Fundamentals of Food Engineering. 3rd. ed. Westport, Connecticut. AVI Publishing Co. IN. 660 p.
- 15- Codex Alimentarius- Codex Standard for Fermented Milks CODEX STAN 243-2003.
- 16- Código Alimentario Argentino (CAA), Capítulo VII: Alimentos Lácteos. Art. 576. Administración Nacional de Alimentos. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación, Argentina (2010). http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf
- 17- Código Alimentario Argentino (CAA), Capítulo XVII: Alimentos de Régimen o Dietéticos. Artículo 1389 - (Resolución Conjunta SPReI N° 261/2011 y SAGyP N° 22/2011). Administración Nacional de Alimentos. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación, Argentina (2013). http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XVII.pdf
- 18- Correa Franco, M., Golowczyc, M., De Antoni, G., Pérez, P., Humen, M. & Serradell, M. (2013). Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. *Journal of Medical Microbiology*. DOI: 10.1099.
- 19- De Antoni, G., Pérez, P., Abraham, A. & Añón, C. (1991). Trehalose, a cryoprotectant for *L. bulgaricus*. *Cryobiology* **26**, 149–153.
- 20- Delfederico, L., Hollmann, A., Martinez, M., Iglesias, N.G., de Antoni, G. & Semorile, L. (2006). Molecular identificación and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research* **73**, 20-27.
- 21- de Urza, P. & De Antoni, G. (1997). Induced cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus LBB by preincubation at suboptimal temperatures with a fermentable sugar. *Cryobiology* **35**, 159–164.
- 22- De Vrese, M., Keller, B. & Barth, C.A. (1992). Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) ok kefir. *British Journal of Nutrition* **67**, 67-75.

- 23- Duitschaever, C., Kemp, N. & Smith, A. (1988). Microscopic studies of the microflora of kefir grains and kefir made by different methods. *Milchwissenschaft* **41**, 479-481.
- 24- FAO/WHO. 2001. CODEX Standard for Fermented Milks #243. Available at http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp.
- 25- Farnworth, E. (2005). "Kefir – a complex probiotic". *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* **2** (1), 1–17.
- 26- Garrote, G. L., Abraham, A. G. & De Antoni, G. L. (1997). Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **30**, 77–84.
- 27- Garrote G., Abraham A. & De Antoni G. (1998). Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. *Journal of Dairy Research* **65**, 149-154.
- 28- Garrote, G.L. (1999). Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kefir. 168 p.
- 29- Garrote, G.L., Abraham, A.G. & De Antoni, G.L. (2000). Inhibitory power of kefir: the role of organics acids. *Journal of Food Protection* **63**, 364-369.
- 30- Garrote, G., Abraham, A. & De Antoni, G. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research* **68**, 639–652.
- 31- Garrote, G. L., Londero, A., Hamet, M. F., De Antoni, G. L. & Abraham, A. G. (2012). Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterization. *Journal of Dairy Research* **79**, 262–271.
- 32- Golowczyc, M., Silva J., Abraham, A., De Antoni, G. & Teixeira, P. (2010). Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in Applied Microbiology* **50**, 7–12.
- 33- Güven, A., Güven, A. & Gülmez, M. (2003). The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbón tetrachloride-induced mice tissues. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **50**, 412-416.
- 34- Hertzler, S. R. & Clancy, S.M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association* **103**, 582-587.
- 35- Higl, B., Kurtmann, L., Carlsen, C., Ratjen, J., Fôrst, P., Skibsted, L., Kulozik, U. & Risbo, J. (2007). Impact of water activity, temperature, and physical state on the

- storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnology Progress*. Vol. 23, **4**, 794–800.
- 36- Horwitz W. (1970). Official Methods of Analysis for the AOAC. Washington D.C. Eleventh Edition.
- 37- Hosono, A., Tanabe, T. & Otani, H. (1990). Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft* **45**, 647-651.
- 38- Hough, G. (2006). Curso Taller de Evaluación Sensorial de Alimentos. CIDCA, Centro de Investigación en Criotecnología de Alimentos. 9, 10 y 11 de octubre del 2006. Departamento de Evaluación Sensorial de Alimentos. Instituto Superior Experimental de Tecnología Alimentaria. (ISETA) 108 p.
- 39- Kakisu, E., Abraham, A., Pérez, P. & De Antoni, G. (2007). Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection* **70**, 2613-2616.
- 40- León Peláez, A. (2013). Estudio de la capacidad de los microorganismos del kefir, para inhibir el desarrollo fúngico y para secuestrar micotoxinas. 260 p.
- 41- Lievence, L.C., Verbreck, M.A.M., Noomen, A. & van't Riet, K. (1994) Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**, 90–94.
- 42- Lin, Ch. W. & Kuo, Ch. Y. (1999). Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. *Australian Journal of Dairy Technology* **54**, 14-18.
- 43- Liu, J.R., Wang, S.Y., Chen, M.J., Chen H.L., Yueh, P.Y. & Lin, C.W. (2006). Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British Journal of Nutrition* **95**, 939-946.
- 44- Londero, A., Quinta, R., Abraham, A., Sereno, R., De Antoni, G. & Garrote, G. (2011). Inhibitory activity of cheese whey fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, **74** (1), 94-100.
- 45- Marshall, V.M. (1993). Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *Journal of the Society of Dairy Technology* **46**, 49-56.
- 46- Matissek, Schnepel y Steiner (1998) "Análisis de los Alimentos". I.S.B.N.: 84-200-0850-8.
- 47- Ministerio de Salud-Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". (2001) Manual de procedimientos para la determinación de la

- sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Ministerio de Salud, Instituto Nacional De Enfermedades Infecciosas, Departamento Bacteriología, Servicio Antimicrobianos. Buenos Aires, Argentina. 69 p.
- 48- Molska, I., Moniuszco, I., Komorows, K. & Merilanen, V. (1983). Characteristics of bacilli of *Lactobacillus casei* species appearing in kefir grains. *Acta Alimentaria PoloUnica* **9**, 80-88.
- 49- Murofushi, M., Shiomi, M. & Aibara, K. (1983). Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japanese Journal of Medical Science & Biology* **36**, 49-53.
- 50- Ottogalli, G., Galli, A., Resmini, P. & Volonterio, G. (1973). Composizione Microbiologica, chimica ed ultraestructura dei granuli di Kefir. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* **23**, 109-121.
- 51- Quintero Flórez, A. (2010). Kefir adicionado con hierro, zinc y vitamina A. 160 p.
- 52- Ramírez, J.S. & Cañizares, J. (2003). Deshidratación de la papa mediante Liofilización Atmosférica, Universidad Central del Ecuador, Escuela de Ingeniería Química, Quito, Ecuador.
- 53- Ramírez-Navas, J. S. "Liofilización de Alimentos". Universidad del Valle. Cali, Colombia. Edición 2006. © ReCiTeIA.
- 54- Saloff-Coste, C. J. (1996). Kefir. Nutritional and health benefits of yogurt and fermented milks. *Danone World Newsletter* **11**, 1-7.
- 55- Serradell, M., Bolla, P., de Urraza, P. & De Antoni, G. (2010). Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research* **78**, 15–22.
- 56- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, X. L. & Lima, A. S. (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **152**, 316-325.
- 57- Steponkus, P.L., Uemura, M. & Webb, M.S. (1995). Freezeinduced desestabilization of cellular membranes and lipid bilayers. In *Permeability and Stability of Lipid Bilayers* ed. Disalvo, E.A. and Simon, S.A. pp. 77–104. Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
- 58- Texeira, P.M., Castro, H., Mohácsi-Farkas, C. & Kirby, R. (1997). Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 219–226.

- 59- Thoreux, K. & Schmucker, D.L. (2001). Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *Journal of Nutrition* **131**, 807-812.
- 60- Tymczynszyn, E., Díaz, R., Pataro, A., Sandonato, N., Gómez-Zavaglia & Disalvo, A. (2008). Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *International Journal of Food Microbiology* **128**, 342–347.
- 61- Ulusoy, B.H., Colak, H., Hampikyan, H. & Erkan, M. (2007). An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* **37**, 103-107.
- 62- Vinderola, C. G., Duarte, G., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E. & Matar, C. (2005). Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research* **72**, 195-202.
- 63- Vinderola, C. G., Duarte, G., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E. & Matar, C. (2006). Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology* **211**, 149-156.
- 64- Yokoi, H., Wantanabe, T., Fujii, Y., Toba, T. & Adachi, S. (1990). Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains. *Journal of Dairy Science* **73**, 1684-1689.
- 65- Zourari, A. & Anifantakis, E. M. (1988) Le kefir caracteres physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production. Une revue. *Le Lait* **68**, 373-392.