

**ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA
A PARTIR DE UN SUERO ÁCIDO Y LECHE**

Por

Luis Omar Itara Rodríguez

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Ciencia y Tecnología de Alimentos

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2007**

Aprobado por:

Leyda Ponce de León, PhD.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Lynette E. Orellana, PhD.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Fernando Pérez, PhD.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Maritza De Jesús, MS.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

José Pantoja, PhD.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón de Bravo, PhD.
Coordinadora del Programa Ciencia
y Tecnología de Alimentos

Fecha

Abstract

One of the great problems confronted by the dairy industry today is the disposition of whey obtained during the cheese elaboration. The acid whey has high content of organic matter (COD) and high biological oxygen demand (BOD); which represents an environmental problem. Agencies that regulate the environment exert strong pressure on the dairy industry to develop new alternatives uses and methods to dispose of the acid whey. The objective of this study was to manufacture a fermented beverage, made with acid whey and milk, and determine if the use of this sub-product can generate the organoleptic characteristics of the fermented product called kefir. Five formulations of the beverage were developed (100% Milk, Control 1, 100% Serum, Control 2, 75% Milk / 25% Serum, 50% Milk / 50% Serum, 25% Milk / 75% Serum) and evaluated by proximal analysis, analysis of volatile organic acids and compounds and sensory analysis. We found the fermented beverage of 75% Milk / 25% Serum to have similar characteristics to kefir. These were: Water (90.4%), Solids (9.6%), Fat (2.54%), Protein (2.20%), pH (4.38), Lactic Acid (0.84%), Ethanol (24.89%), Acetic Acid (0.84%) and 2,3-butanediol (1.10%). A sensorial analysis to some specific beverages was made in where panelists did not found significant differences between the samples they were testing. The acid whey can be used in the manufacture of kefir like a fermented beverage as long as it is in an amount no higher than 25%. This study represents a possible alternative to the problem of the acid whey disposition confronted by the dairy industry.

Resumen

Uno de los grandes problemas que hoy día confronta la industria lechera es la disposición de suero obtenido durante la elaboración de los quesos. Esto se debe a que el suero ácido posee un alto contenido de materia orgánica (COD) y una alta demanda de oxígeno biológico (BOD) lo que representa un problema ambiental. Las agencias que regulan el medio ambiente ejercen una fuerte presión a la industria lechera para que desarrollen nuevas alternativas con el fin de encontrar una solución a la disposición del suero ácido. El objetivo de este estudio fue elaborar una bebida fermentada a base de suero ácido y leche con el propósito de determinar si este sub-producto puede utilizarse para elaborar una bebida fermentada con características organolépticas similares al kefir. Se elaboraron formulaciones de la bebida (100% Leche, Control 1, 75% Leche / 25% Suero, 50% Leche / 50% Suero, 25% Leche / 75% Suero y 100% Suero, Control 2) a las cual se les realizó estudios de análisis proximal, análisis de ácidos orgánicos y compuestos volátiles y análisis sensorial. Al concluir el estudio se encontró que la bebida 75% Leche / 25% Suero mostró poseer las características similares al kéfir. Estas eran: Agua (90.4%), Sólidos Totales (9.6%), Grasa (2.54%), Proteína (2.20%), pH (4.38), Ácido Láctico (0.84%), Etanol (24.89%), Ácido Acético (0.84%) y 2,3-butanediol (1.10%). Se realizó un análisis sensorial a unas bebidas en específico donde los panelistas no encontraron diferencias significativas entre las muestras que estaban evaluando. El suero ácido puede ser utilizado en la elaboración de una bebida fermentada parecida al kéfir siempre y cuando sea en una inclusión no mayor al 25%. Este estudio representa una posible alternativa al problema de disposición de suero ácido que confronta la industria lechera.

**Derechos de Autor Reservados ©
Luis Omar Itara Rodríguez
2007**

Dedicatoria

A Dios

A mis padres (Luis A. Itara y Edna Rodríguez) por brindarme todo el apoyo incondicional durante el largo de esta carrera. A mis hermanos (Ahmed Itara, Jorge, Liza y Lilly Franceschi) que al igual que mis padres confiaron en mí y me brindaron todo su apoyo para completar esta meta. A la Dra. Leyda Ponce de León por darme la oportunidad para trabajar en este proyecto y proveerme todas las herramientas necesarias para terminarlo. Usted ha sido como una segunda madre para mí por todo lo que hizo durante el largo de esta travesía.

Agradecimientos

Expreso un cordial agradecimiento al Departamento de Industria Pecuaria por facilitarme sus facilidades para llevar a cabo parte de este proyecto. En especial a la Dra. Leyda Ponce de León, presidenta del comité graduado que me ofreció la oportunidad de trabajar en este proyecto y sin dudar de mi capacidad puso toda su confianza en mí para terminar esta investigación. Gracias por sus buenos consejos y su apoyo incondicional en esos momentos de frustración que ocurrieron durante el transcurso de esta carrera. Usted sí que representa lo que es un verdadero precursor de la enseñanza en todo el sentido de la palabra. Más personas como usted hacen falta en esta vida, Dios la bendiga.

Al Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos por facilitarme las facilidades del laboratorio de química y microbiología de alimentos. A la Dra. Negrón al igual que la Dra. Lynette Orellana gracias por brindarme una excelente enseñanza, al igual que su ayuda, durante todo este tiempo.

A la estudiante sub-graduada Marianne Pérez Bosch del Departamento de Química bajo la dirección de la Prof. Maritza De Jesús Echevarría del Departamento de Química del RUM por su ayuda y su gran colaboración en determinar los compuestos volátiles y ácidos orgánicos de las distintas bebidas fermentadas.

Al Dr. Fernando Pérez Muñoz por su ayuda y consejería a la hora de determinar la viscosidad de las distintas bebidas fermentadas.

Al Dr. Raúl Macchiavelli y a la Dra. Linda Beaver por su ayuda y consejería en cuanto a los análisis estadísticos efectuados en este estudio investigativo.

A la Sra. Magaly Zapata por facilitarme el uso del espectrofotómetro para medir el por ciento de ácido láctico de las bebidas fermentadas.

A los técnicos del laboratorio de Industria Pecuaria (Miguel Rivera e Hiram Vélez), gracias por toda la ayuda que me brindaron durante el tiempo de investigación.

A todos los compañeros de CITA, en especial a mi gran amiga y compañera de hospedaje, Ileana Rivera, por todo lo que hiciste por mí durante el transcurso de esta carrera.

A la Sra. Ivette Vissepó por todo lo que hace por los estudiantes del Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos. A la verdad que usted es un ángel caído del cielo, por que posee una paciencia incalculable y siempre encuentra una solución a los problemas de uno. Gracias por todo.

Al Sr. Miguel Ruperto por toda la ayuda que me brindó durante esta investigación. Usted si que tiene una habilidad para ponerle a uno una sonrisa en la cara en esos momentos en que surgen problemas en el laboratorio y además ayuda a uno a resolverlo.

Tabla de Contenido

Abstract.....	ii
Resumen.....	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Lista de Cuadros.....	x
Lista de Figuras.....	xi
Apéndices.....	xii
Introducción.....	1
Revisión Literaria.....	3
Materiales y Métodos.....	12
Recurso del Suero Ácido.....	12
Estandarización de la Leche.....	12
Neutralización de la Acidez del Suero Ácido Antes de la Fermentación.....	13
Desarrollo de un Proceso de Manufactura para Obtener una Bebida Fermentada.....	13
Proporción del Suero Ácido a la Leche.....	13
Tipo y Condiciones de Cultivos para los Microorganismos Iniciadores...	13
Acidez Titulable y pH.....	14
Análisis Proximal.....	14
Sólidos Totales y Humedad.....	14
Grasa.....	15
Proteína.....	16

Viscosidad.....	17
Ácido Láctico.....	17
Recuento de Bacterias Lácticas.....	18
Análisis de Ácidos Orgánicos y Compuestos Volátiles.....	19
Análisis Sensorial.....	21
Análisis Estadístico.....	22
Resultados y Discusión.....	23
Análisis de pH.....	23
Acidez Titulable.....	25
Composición Química de las Bebidas Fermentadas.....	28
Viscosidad.....	32
Ácido Láctico.....	35
Análisis Microbiológico.....	37
Análisis de Ácidos Orgánicos y Compuestos Volátiles.....	41
Análisis Sensorial.....	48
Conclusiones.....	49
Recomendaciones.....	53
Bibliografía.....	54
Apéndices.....	58

Lista de Cuadros

Cuadro 1: Valores promedio de pH y desviación estándar de las distintas bebidas fermentadas.....	25
Cuadro 2: Composición Química de las Bebidas Fermentadas.....	29
Cuadro 3: Valores de n y K para las Bebidas Fermentadas.....	34
Cuadro 4: Componentes Volátiles de una Bebida Fermentada (100% Leche).....	43
Cuadro 5: Componentes Volátiles de una Bebida Fermentada (100% Suero).....	44
Cuadro 6: Componentes Volátiles de una Bebida Fermentada (75% Leche / 25% Suero).....	44
Cuadro 7: Componentes Volátiles de una Bebida Fermentada (50% Leche / 50% Suero).....	45
Cuadro 8: Componentes Volátiles de una Bebida Fermentada (25% Leche / 75% Suero).....	46

Lista de Figuras

Figura 1: Valores de acidez titulable al inicio y al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	27
Figura 2: Valores de viscosidad al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	34
Figura 3: Valores de ácido láctico al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	36
Figura 4: Población de bacterias lácticas al inicio y al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	40
Figura 5: Cromatograma de iones totales (CIT) para las bebidas fermentadas de 100% Leche y 100% Suero.....	43
Figura 6: Cromatograma de iones totales (CIT) para las bebidas fermentadas de 100% Leche y 75% Leche / 25% Suero.....	45
Figura 7: Cromatograma de iones totales (CIT) para las bebidas fermentadas de 100% Leche y 50% Leche / 50% Suero.....	46
Figura 8: Cromatograma de iones totales (CIT) para las bebidas fermentadas de 100% Leche y 25% Leche / 75% Suero.....	47
Figura 9: Estándares de los compuestos volátiles de acetoin, acetaldehído y etanol.....	47

Apéndices

Cuadro 1: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del pH al inicio de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	59
Cuadro 2: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del pH al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	60
Cuadro 3: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del cambio en pH para las distintas bebidas fermentadas.....	61
Cuadro 4: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey de la acidez titulable al inicio de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	62
Cuadro 5: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey de la acidez titulable al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	63
Cuadro 6: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del cambio en acidez titulable para las distintas bebidas fermentadas.....	64
Cuadro 7: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey de los sólidos totales al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	65
Cuadro 8: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del por ciento de grasa al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	66
Cuadro 9: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del por ciento de proteína al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas....	67
Cuadro 10: Análisis de varianza y regresión lineal del ácido láctico para las distintas al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	68
Cuadro 11: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey de las bacterias lácticas al inicio de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	69
Cuadro 12: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey de las bacterias lácticas al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas.....	70
Cuadro 13: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey para el cambio en bacterias para las distintas bebidas fermentadas.....	71

Formularios

Formulario 1: Guía del Experimentador para verificar cuantos panelistas acertaron correctamente.....	72
Formulario 2: Hoja que el panelista utilizó para contestar cuales eran las formulaciones diferentes.....	73

Lista de Figuras

Figura 1: Las distintas bebidas fermentadas dentro de la incubadora a 25 °C por alrededor de 24 horas.....	74
Figura 2: Preparación del medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe “MRS”	74
Figura 3: Jarra (Gas Pack) con placas petri lista para ser incubada a 37 °C por 48 horas.....	75
Figura 4: Placa petri con colonias típicas de Lactóbacilos en medio de cultivo “MRS”	75
Figura 5: Digestor (RapadStill II, Model 65200, Labconco) utilizado para determinar la Proteína cruda (Método Kjeldahl) en las distintas bebidas fermentadas.....	76
Figura 6: Digestión de la materia orgánica.....	76
Figura 7: Apariencia Final de la muestra una vez finalizada la digestión de la materia orgánica.....	77
Figura 8: Apariencia Final de la muestra titulada con HCL 0.1N para determinar la cantidad de borato de amonio formado.....	77
Figura 9: Viscosímetro (Brookfield LVDV III) utilizado para medir la viscosidad a las distintas bebidas fermentadas.....	78
Figura 10: Adaptador (A-10 UL) utilizado en las proporciones de fermentados menos viscosos.....	78
Figura 11: Espectrofotómetro (Back Scientific 100 Vis Spectrophotometer, Model 6300, Serial Number: 6370) utilizado para medir el por ciento de ácido láctico en las distintas bebidas fermentadas.....	79
Figura 12: Cromatógrafo de Gas (HP5890 Series II Plus) y Detector Selectivo de Masa (HP 5971) utilizado para medir los compuestos volátiles y ácidos orgánicos de las distintas bebidas fermentadas.....	79

Introducción

El suero ácido es un subproducto de la industria lechera que se obtiene mediante la precipitación y remoción de la caseína de la leche durante la elaboración del queso blanco. Este subproducto representa aproximadamente de un 85 a un 90% del volumen de la leche y retiene 55% de los nutrientes de ella. Los nutrientes que están en mayor abundancia en el suero ácido son; lactosa, lípidos, proteínas solubles y minerales (Siso, 1996). El suero ácido representa un problema ambiental muy importante, esto se debe a su alto contenido de materia orgánica (COD) y su alta demanda de oxígeno biológico (BOD) (Ben-Hassan and Ghaly, 1994). Por tal razón, existe una fuerte presión por parte de las agencias que regulan el medio ambiente las cuales exigen que la industria lechera desarrolle nuevas tecnologías con el fin de re-utilizar el suero (Castillo, 1990). Para poder descartar el suero ácido al ambiente, éste tiene que pasar primero por unos tratamientos que son altamente costosos para la industria lechera (Tin and Mawson, 1993).

Otro problema que la Industria Lechera enfrenta es la disminución del consumo de leche por parte de la sociedad. En parte, esto se debe a las nuevas bebidas que han surgido en la industria de los alimentos. Entre estas se encuentran las bebidas carbonatadas, energizantes, jugos, té de limón y agua embotellada. Para que la Industria Lechera pueda competir debe introducir al mercado de alimentos, leches con saborizantes en empaques llamativos para que el consumidor se interese en consumirlos (Boor, 2001).

Una posible alternativa a las situaciones anteriormente expuestas, sería incorporar el suero ácido a la leche y elaborar una bebida fermentada parecida al kéfir. El kéfir es una bebida fermentada a base de leche que es refrescante, de consistencia medianamente espesa, ligeramente gaseosa, levemente ácida y alcohólica. Esta bebida se origina en las

montañas Caucásicas de Rusia. La fermentación de esta bebida es diferente a otros productos lácteos fermentados porque es el resultado de una relación simbiótica entre bacterias lácticas y levaduras, las cuales son responsables de una fermentación ácido alcohólica (Lin, et. al, 1999). La bebida de kéfir en los últimos años se ha popularizado debido a sus propiedades probióticas tales como, la reducción de los niveles de colesterol en la sangre, el fortalecimiento de las defensas frente a infecciones virales y bacteriales y mejoramiento de la capacidad de asimilación de los alimentos (Farnworth, et. al, 2003).

El objetivo principal de este estudio fue elaborar una bebida fermentada a base de suero ácido y leche con el propósito de determinar si la utilización de este sub-producto puede generar las características organolépticas similares al kéfir. Para cumplir con este objetivo se elaboraron cinco formulaciones diferentes (100% Leche, Control 1, 100% Suero, Control 2, 75% Leche / 25% Suero, 50% Leche / 50% Suero, 25% Leche / 75% Suero) a las cuales se les realizaron estudios de análisis proximal, análisis de ácidos orgánicos y compuestos volátiles y análisis sensorial con el fin de determinar si el suero ácido se podía utilizar en la elaboración de una bebida fermentada.

Revisión Literaria

Uno de los problemas grandes que hoy día esta teniendo la industria lechera es la disposición de suero obtenido durante la elaboración de quesos. Dicho suero posee como componentes principales a la lactosa (4.9%), proteínas (0.55%), grasa (0.04%), minerales (0.8%) y ácido láctico (0.4%) (Jelen, 1992). Aproximadamente el 47% de las 140 millones de toneladas de suero que se produce anualmente a nivel mundial se dispone en la tierra, plantas de tratamiento de agua, ríos, lagos y otros cuerpos de agua (Guimaraes, et. al, 1992). Este dato implica una gran pérdida de recursos y un serio problema de contaminación debido a que el suero es altamente orgánico; con una alta demanda bioquímica de oxígeno (BOD) de 40,000 a 60,000 ppm y una demanda de oxígeno producida químicamente (COD) de 50,000 a 80,000 ppm (Ben-Hassan and Ghaly, 1994).

Para que el suero pueda ser descartado al medio ambiente tiene que pasar por un tratamiento. Este tratamiento es bien costoso para las industrias lecheras, por tal razón, se buscan alternativas para la utilización del suero (Tin and Mawson, 1993). Entre las alternativas disponibles, está la utilización de los componentes del suero. Eso implica extraer los ingredientes principales como la lactosa y las proteínas. Las proteínas del suero se pueden recuperar por el proceso de ultrafiltración para luego ser vendidas en concentrado. La lactosa del suero puede ser fermentada utilizando levaduras para convertirla a etanol (Marwaha and Kennedy, 1988). Al menos 10 industrias lecheras a nivel mundial utilizan esta técnica para utilizar el suero (Mawson, 1994; Murtagh, 1995).

El suero ácido proveniente de la precipitación de la caseína por la acción de ácidos débiles en elaboración de queso blanco es aún menos utilizado que el suero dulce. El queso blanco elaborado con ácido acético posee una textura diferente al queso

elaborado con renina. Entre los grandes factores que limitan el uso del suero ácido se encuentra su alto contenido de ceniza y su acidez (pH 4.3 – 4.6), debido a esto produce problemas funcionales y problemas de sabor (Gruetzmacher y Bradley, 1991). Solo un pequeño por ciento es utilizado para alimento de seres humanos, el resto se utiliza para alimento de animales, se deposita en plantas de tratamiento de aguas usadas, o se esparce en la tierra como fertilizante (Gruetzmacher y Bradley, 1991). Hay que tener en cuenta que para que el suero ácido pueda ser esparcido como fertilizante en la tierra tiene que primero pasar por un tratamiento que es altamente costoso para las industrias lecheras (Gruetzmacher y Bradley, 1991). Entre los tratamientos se encuentra la desmineralización y la ultrafiltración del suero. Ambos métodos se utilizan para recuperar las proteínas que están presentes en el suero. Una vez recuperadas por dichos tratamientos, el restante del suero puede ser esparcido en la tierra como fertilizante (Gruetzmacher y Bradley, 1991).

Al igual que el suero ácido, el suero dulce posee un alto contenido de ceniza y es un subproducto de la industria de queso, pero es menos ácido (pH 5.9 – 6.6) y es producido por la coagulación de la leche con renina. Sin embargo, a diferencia del suero ácido puede ser utilizado por sus numerosas propiedades funcionales como dar color, brindar tamaño y producir espuma. También posee una mezcla compleja de lactosa, proteínas, minerales, con pequeñas cantidades de humedad y grasa. Por estas razones la industria de alimento ha reconocido que el suero dulce es un buen ingrediente en la incorporación a un alimento (Banavara, et. al, 2003). Al igual que el suero ácido, el suero dulce también es utilizado como un componente importante en los alimentos de animales (Banavara, et. al, 2003). Actualmente el suero dulce es más utilizado por las industrias

lecheras que el suero ácido por sus numerosas propiedades funcionales (Banavara, et. al, 2003).

Otro de los problemas que confronta la industria lechera en las últimas décadas es que el consumo de leche, al igual que los niveles de calcio en niños y adolescentes, ha disminuido debido a que prefieren el consumo de bebidas azucaradas y carbonatadas (Cavadini, et. al, 2000; Nielsen, et. al, 2002). Hoy en día los productos líquidos a base de leche compiten con un sin número de bebidas entre ellas se encuentra agua embotellada, bebidas energizantes y té de limón (Boor, 2001). Entre los años del 1977 al 2001, los americanos aumentaron su ingestión de energía total debido al consumo de bebidas de frutas y azucaradas y reducción en la ingestión de leche. Este incremento fue de 2.8% a 7.0% de energía por parte de las bebidas azucaradas, esto se puede traducir en que se triplicaron las calorías (de 50 kcal a 144 kcal) (Nielsen and Popkin, 2004). Mientras que la energía adquirida por bebidas de frutas aumentó de un 1.1% a 2.2% (de 20 kcal a 45 kcal). En comparación con las bebidas de frutas y azucaradas, la energía adquirida por parte de la leche disminuyó de un 8.0% a 5.0% (de 143 kcal a 99 kcal) (Nielsen and Popkin, 2004).

Esto es interesante por que durante los años del 1977 al 1996 el consumo de bebidas azucaradas aumentó alrededor de un 15% mientras que el consumo de leche disminuyó un 12%. Un estudio realizado a la población americana mostró que estos prefieren tomar bebidas azucaradas en sus comidas y meriendas en vez de consumir leche (Nielsen and Popkin, 2004). También se ha encontrado que el aumento en el consumo de bebidas azucaradas ha tenido un efecto sobre la obesidad y los desordenes metabólicos en la población americana (Nielsen and Popkin, 2004).

Esta es una de las razones por la cual el Departamento de Salud desarrolló una campaña contra la epidemia de la obesidad debido a la alimentación deficiente que tiene la población americana (Nielsen and Popkin, 2004).

La industria lechera ha tenido que recurrir a nuevas estrategias para aumentar el consumo de leche en niños y adolescentes, y para combatir las adversidades propiciadas por las bebidas (azucaradas, carbonatadas, frutas) que se encuentran en el mercado de alimentos. Esas estrategias incluyeron desarrollar una campaña publicitaria demostrando que la leche es una fuente importante de calcio, vitamina D y proteínas para el desarrollo de niños y adolescentes (Nielsen and Popkin, 2004). Se ha desarrollado nuevos empaques y tamaños más atractivos para el consumidor y que se adapten a los estilos de vida modernos. Nuevos productos se han integrado al mercado como leche con sabores (vainilla, chocolate, fresa y guineo), yogurt líquido y leches fermentadas (kéfir) las cuales están ganando popularidad por sus alegados beneficios a la salud (Boor, 2001).

El kéfir es una bebida de leche fermentada que se ha definido como el yogurt del siglo XXI (Simova, et. al, 2002), comúnmente consumida en la comunidad de Estados Independientes (Rusia, Polonia, Hungría, Czechoslovakia y Scandinavia). Es un producto ligeramente alcohólico y ácido que se originó en las montañas Caucásicas de Rusia. Esto se encuentra entre el Mar Negro y el Mar Caspio, donde tradicionalmente se ha elaborado en bolsas o recipientes de cuero (Güven y Gülmez, 2003). Estudios han demostrado los efectos beneficiosos del kéfir por sus propiedades antioxidantes. Esta bebida de leche fermentada se ha popularizado recientemente debido a sus propiedades probióticas (Viljoen, et. al, 2003).

El término probiótico ha surgido recientemente a raíz de ciertos productos lácteos enriquecidos con bacterias del género lactóbacilos y bifidobacterias, denominadas “benéficas” para la salud del sistema digestivo en su función de metabolizar y absorber los nutrientes (Heller, 2001). Se ha encontrado que dichas bacterias reducen enfermedades gastrointestinales, inflamatorias, alérgicas, respiratorias, previenen el cáncer y estimulan el sistema inmunológico (Farnworth, et. al, 2003).

El kéfir puede ser elaborado con leche de vaca, cabra, oveja, camello, búfalo y hasta con la llamada leche de soya (Viljoen, et. al, 2003). Los granos de kéfir se obtienen de la fermentación de la leche cruda a una temperatura de 25 °C. Estos son de color blanco a amarillo, parecido al arroz cocido o a pequeñas cabezas de coliflor. Estos granos al poseer una estructura específica, se comportan biológicamente como organismos viables. Ellos crecen, se propagan y pasan todas sus propiedades a las siguientes generaciones de nuevos granos. Los granos son insolubles en agua, gelatinosos y de tamaño irregular (Britz y Schoevers, 2003). Los gránulos de kéfir son mantenidos unidos por un polisacárido llamado kefiran. Los granos utilizados para la fermentación de la bebida no pueden ser reconstituidos, pero son recuperados de la leche amarga y utilizados repetidamente (Schoevers y Britz, 2003). Cuando se añaden a la leche se expanden y se tornan blancos, formando un producto reducido y gelatinoso (Schoevers y Britz, 2003). La producción de granos de kéfir está basada en una continúa cultivación de la leche, donde resulta en un aumento de biomasa de 5 a 7% por día. Tan pronto la fermentación se ha completado los granos son removidos de la leche con un colador y son introducidos a la leche fresca (Viljoen, et. al, 2003). Sin embargo, el crecimiento puede ser retardado si los granos son rociados con agua después de ser colados (Viljoen, et. al, 2003). La

temperatura óptima para llevar a cabo la fermentación de los granos es 25 °C por 22 horas, pero puede estar en un rango de 22 – 25 °C. La leche con un alto contenido de grasa puede inhibir el proceso de fermentación (Britz y Schoevers, 2003). Cuando la bebida de kéfir se agita, forma espumas y burbujas. La agitación de la leche bajo en grasa y la adición de triptosa o extracto de levadura realzan el aumento de masa de los granos. Sin embargo, sin la adición de extracto de levadura o triptosa, los granos aumentan el doble de su tamaño si se agitan los envases (Britz y Schoevers, 2003).

La bebida de kéfir es refrescante y posee un sabor ácido, a causa del ácido láctico producido por las bacterias lácticas. Al tener levaduras estas producen alrededor de 2% de alcohol y otros productos responsables del sabor y el aroma exótico del kéfir (Viljoen, et. al, 2003). El kéfir es una bebida naturalmente carbonatada al tener dióxido de carbono producida durante la fermentación heterofermentativa de la lactosa, lo que le da una característica refrescante. Otros compuestos producidos durante la fermentación del kéfir son el ácido propiónico, ácido fórmico, acetaldehído, diacetil, acetoina (Güven y Gülmez, 2003).

La mayoría de los productos lácteos fermentados son producidos mediante el uso de bacterias lácticas como cultivos iniciadores en vez de las levaduras. El kéfir es una excepción a la regla, al ser un producto producido por la actividad fermentadora de bacterias y levaduras (Schoevers y Britz, 2003). La utilización de una levadura no fermentadora de lactosa junto a un cultivo láctico y la adición de pequeñas cantidades de glucosa son recomendados para el desarrollo de un kéfir de alta calidad (Schoevers y Britz, 2003). La microflora de los granos de kéfir es bastante estable porque contiene lactobacilos, estreptococos, micrococos y también levaduras en una relación simbiótica

(Viljoen, et. al, 2003). Los granos de kéfir retienen su actividad por años si se preservan y se incuban bajo condiciones culturales y fisiológicas apropiadas (Simova, et. al, 2002). La flora microbial que predomina en los gránulos kéfir consiste de bacterias homofermentativas y heterofermentativas como *Lactobacillus kéfir*, *L. brevis*, *L. helveticus* ssp. *jugurti*, *L. caucasicus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. kefiranofaciens*, *L. cellobiosus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* ssp. *Lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc kéfir*, *Lactococcus filant*, *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus durans* (Simova, et. al, 2002).

Durante la fermentación del kéfir, el crecimiento de las bacterias lácticas ($10^8 - 10^9$) es favorecido sobre el crecimiento de las bacterias acéticas ($10^5 - 10^6$) y las levaduras ($10^5 - 10^6$) (Koroleva, 1982). Estudios por Koroleva (1982), han demostrado que los lactóbacilos producen un sin número de compuestos antimicrobiales. Entre esos compuestos se encuentran los ácidos orgánicos (ácido acético y láctico), dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, etanol, diacetil y péptidos. Dichos compuestos pueden ser beneficiosos en la reducción de patógenos y bacterias dañinas durante la elaboración y almacenamiento de alimentos (Koroleva, 1982). También pueden resultar beneficiosos en la prevención y tratamientos de desordenes gastrointestinales e infecciones vaginales (Tahara y Kanatani, 1997; Zamfir, et. al, 1999; Bonadé, et. al, 2001; Messens y De Vuyst, 2002; Jamuna y Jeevaratnam, 2004).

Las levaduras juegan un rol importante en la fermentación del kéfir, estas le proveen un sin número de nutrientes esenciales como amino ácidos (leucina, valina, lisina, serina)

y vitaminas, alteran el pH, producen etanol y dióxido de carbono (Viljoen, et. al, 2001). Los granos de kéfir usualmente contienen levaduras que fermentan la lactosa como *Saccharomyces kéfir*, *S. unisporous*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Candida kéfir*, *Torula kéfir*, entre otros (Britz y Schoevers, 2003). La función de los microorganismos que constituyen los granos de kéfir puede incluir la producción de ácido láctico, antibióticos y sustancias bactericidas, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patogénicos y no deseados en el kéfir (Güven y Gülmez, 2003).

Existen varios factores que pueden afectar las características organolépticas (sabor, viscosidad, composición química y microbiológica) del kéfir. Entre esos factores se encuentra: la cantidad de inóculo añadido a la leche, la razón de agitación durante la fermentación y la temperatura de refrigeración después de la fermentación (Koroleva, 1988).

En las ultimas décadas, algunas cepas de bacterias ácido lácticas que pertenecen al género bifidobacterias y lactóbacilos han sido incorporadas en productos alimenticios para consumo humano, con el objetivo de mejorar la salud humana. Estas son nombradas bacterias probióticas y son definidas como microorganismos vivos, que mejoran la digestión y ejercen ventajas a la salud más allá de una nutrición básica (Corrieu, et. al, 2002). Los productos lácteos fermentados son los más utilizados como vehículos alimenticios para estas bacterias, por su reputación de productos sanos (Corrieu, et. al, 2002).

El kéfir contiene un sin número de actividades biológicas que incluyen efectos inmunoestimuladores en animales y antitumores, una acción antioxidante mediante la peroxidación de lípidos, efectos antidiabéticos, propiedades antibacteriales y antihongos,

y efectos probióticos o prebióticos (Farnworth, et. al, 2003). Varios estudios en seres humanos han demostrado que el consumo de kéfir puede reducir niveles de colesterol (Vujicic, et. al, 1992), y puede actuar como una alternativa del yogurt para mejorar la digestión de lactosa (Hertzler y Clancy, 2003).

La elaboración de una bebida fermentada a base de suero ácido y leche atiende la necesidad de utilizar un sub-producto que está siendo pobremente utilizado en la isla. En el año 2005 se desecharon alrededor de 4 millones de cuartillos de este material en nuestros cuerpos de agua (Trinidad, 2005). El desarrollo de productos a base de leche ayudaría a diversificar una industria que básicamente depende de un solo producto (leche fluida).

Materiales y Métodos

• Recurso del Suero Ácido

Para asegurar la uniformidad e inocuidad, el suero ácido se elaboró en el Laboratorio de Leche y sus Productos del Departamento de Industria Pecuaria. La leche cruda se obtuvo de la vaquería de la Sub-estación Experimental en Lajas, Colegio de Ciencias Agrícolas. La leche se pasteurizó a 63 °C por 30 minutos previo a la elaboración del queso. El queso blanco se elaboró calentado la leche a 85 °C y añadiendo ácido acético para precipitar la caseína, el suero obtenido se recolectó bajo condiciones sanitarias y fue filtrado y homogenizado previo a su uso. De no utilizarse inmediatamente para la realización de las bebidas fermentadas se mantuvo refrigerado a 5 °C, por un tiempo no mayor de 24 horas.

• Estandarización de la Leche

Al recibir la leche de la vaquería se le determinó el por ciento de grasa utilizando la prueba de Babcock (AOAC, 989.04). Una vez se determinaba el valor, se procedía a descremarla para obtener la crema y la leche descremada, que luego eran pasteurizadas y homogenizadas. La leche se estandarizaba a 3.1% de grasa para que hubiese uniformidad entre las replicaciones, utilizando fórmulas de balance de masas, se mezclaron las proporciones de crema y leche requeridas. Se verificaba que la estandarización de la grasa estuviera correcta realizando una prueba de Babcock.

- **Neutralización de la Acidez del Suero Ácido Antes de la Fermentación**

El suero ácido posee un pH de 4.6, para permitir la fermentación de las bacterias lácticas, el pH se neutralizó a 6.6 utilizando una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 6N.

- **Desarrollo de un Proceso de Manufactura para Obtener una Bebida Fermentada**

- a. Inclusión de Suero Ácido a la Leche

Se prepararon las siguientes formulaciones: 0% de Leche / 100% de Suero, 25% de Leche / 75% de Suero, 50% de Leche / 50% de Suero, 75% de Leche / 25% de Suero, y 100% de Leche / 0% de Suero. De cada formulación se depositó 400 ml por separado en matraces Erlenmeyer con tapa de rosca de 500 ml previamente rotulados para cada formulación. Una vez las mezclas de leche y suero ácido estuvieron preparadas en sus respectivos envases se les añadió un inóculo comercial. Este proceso se llevo a cabo una vez durante tres replicaciones.

- b. Tipo y Condiciones de Cultivos para los Microorganismos Iniciadores

Se utilizó un inóculo comercial de kefir (“Kefir Starter”, Body Ecology™, Decatur, GA) como microorganismos iniciadores. El nivel de inoculación para las cinco formulaciones fue de 2.0%, una vez depositado el inóculo en cada envase se procedió agitarlos rigurosamente para mezclar el inóculo con el contenido de cada envase. Luego se incubaron en una incubadora (Fisher Scientific Isotemp Incubator) a 25 °C, por el tiempo que fuera necesario hasta

que las bebidas fermentadas alcanzaran un pH final de 4.4. El tiempo de incubación fluctuó entre 16 a 24 horas. Al finalizar la fermentación los distintos envases fueron almacenados en un refrigerador (GE™) a 5 °C para detener la fermentación y poder ser utilizados posteriormente para los distintos análisis. Este proceso se realizó una vez durante tres repeticiones.

c. Acidez Titulable y pH

A todas las bebidas fermentadas se le midió su acidez y pH al inicio (0h) y al final de la fermentación cuando alcanzaran un pH aproximado de 4.4 (Athanasiadis, et. al, 2004). Durante el período de 16 a 24 horas de la fermentación se midió el pH durante cada hora hasta que las formulaciones alcanzaran el pH de 4.4. La acidez se midió en base al por ciento de ácido láctico titulando con una solución de NaOH 0.1N, utilizando fenolftaleína como indicador. Para medir el pH se utilizó un potenciómetro (Accumet Basic, AB 15 pH Meter, Fisher Scientific).

• **Análisis Proximal**

a. Sólidos Totales y Humedad

El por ciento de sólidos totales (AOAC, 925.23) se determinó secando 3 gramos de la bebida fermentada en un horno convencional por 16 horas a 100 °C. Al cabo de las 16 horas se calculó el por ciento de sólidos totales por la diferencia en masa. La humedad se calculó restando el por ciento de sólidos

totales a un valor de 100. Este proceso se llevo acabo por duplicado para cada formulación durante las tres replicaciones.

b. Grasa

El por ciento de grasa de las bebidas fermentadas se determinó mediante el método de Mojonnier (AOAC, 989.05). Este método consistió en depositar en un frasco de extracción de grasa, 10 gramos de la bebida fermentada, que fue pesado en una balanza analítica de 4 lugares decimales (Accu-124, Fisher Scientific). A la muestra se le añadió 1.5 mL de hidróxido de amonio para neutralizar cualquier ácido presente y disolver la caseína. Se añadieron 3 gotas del indicador fenolftaleína para poder observar la interfase entre las capas orgánica y acuosa durante la extracción. Luego se añadieron 10 ml de alcohol etílico, 25 ml de éter dietílico y 25 ml de éter de petróleo. Durante la adición de cada uno de los reactivos se agitaron los frascos por alrededor de 2 minutos. Una vez se añadieron todos los reactivos se dejó reposar el frasco de extracción por 30 minutos, al cabo de ese tiempo se extrajo la fase orgánica y se depositó en un plato de cristal previamente pesado. La extracción de la grasa se repitió dos veces. Después que se extrajo la fase orgánica, se procedió a evaporar los solventes en una plancha caliente (Isotemp Hotplate, Cat. No. 11-600-49H/7.4A). Por último, el plato de cristal se colocó en el horno por 10 minutos a 100 °C, y se dejó enfriar en un desecador por alrededor de 15 minutos. Se pesó el plato de cristal y se obtuvo el por ciento de grasa por la

diferencia en masa. Este proceso se llevo acabo por duplicado para cada formulación durante las tres replicaciones.

c. Proteína

El por ciento de proteína de las bebidas fermentadas se determinó mediante el método de Kjeldahl (AOAC, 920.105). Este método consistió en pesar 0.120 a 0.150 gramos de la muestra en un plato de pesada al cual se añadió 2 ml de agua destilada para poder ser transferida. Luego se transfirió la muestra a un tubo de digestión de 100 mL al cual se le agregó un agente catalizador de sulfato de potasio (K_2SO_4) y sulfato de cobre ($CuSO_4$) y 7 ml de ácido sulfúrico. Después se procedió a colocar los tubos en un bloque de digestión (2020 Digestor, Foss Tecator) donde fueron calentados a 350 °C por alrededor de 3 a 4 horas o hasta que las muestras se tornaron verde esmeralda. Al finalizar ese tiempo se sacaron los tubos del bloque de digestión y se dejaron enfriar en una gradilla. A los tubos (fríos) con la muestra digerida se le añadió 40 ml de agua destilada en 2 porciones para disolver los cristales formados. La solución de los tubos de digestión fue transferida a los tubos de destilación. Las muestras se destilaron en un destilador (RapadStill II, Model 65200, Labconco) añadiendo 25 mL de una solución de ácido bórico al 4% y hidróxido de sodio concentrado. La destilación se llevo a cabo por 8 minutos y al finalizar la misma, el líquido destilado fue titulado con una solución de HCl 0.1N. La cantidad de nitrógeno en las muestras fue determinado con una reacción estequiométrica entre los moles de borato y moles de nitrógeno. La

proteína total en las muestras fue calculada usando una constante de 6.38. Este proceso se llevo acabo por duplicado para cada formulación durante las tres replicaciones.

• **Viscosidad**

La viscosidad de las bebidas fermentadas (100% leche / 0% suero, 75% leche / 25% suero y 50% leche / 50% suero) fue medida utilizando un viscosímetro (Brookfield LVDV III) con un agitador #2. Para medir la viscosidad del suero ácido (100% suero / 0% leche) y la bebida fermentada de 25% leche / 75% suero se utilizó el mismo equipo pero con un adaptador A-10 UL. A la hora de medir la viscosidad de una de las bebidas fermentadas se procedía a depositar 300 ml de la bebida en un vaso de 500 ml. Luego se llevaba el vaso con la muestra al viscosímetro para medir su viscosidad. Este proceso se llevo acabo una sola vez para cada bebida fermentada durante las tres replicaciones.

• **Ácido Láctico**

La cantidad de ácido láctico de las bebidas fermentadas fue determinado utilizando un análisis bioenzimático (D-Lactic Acid / L-Lactic Acid, R-Biopharm, Cat. No. 11-112-821-035). Las muestras se filtraron utilizando un filtro (Millipore Syringe Driven Filter Unit 25mm 0.22 μ m) para eliminar cualquier impureza y ponerla incolora. Se diluyeron a una razón de 1/100 para que leyeran dentro del largo de onda de 340 nm. Se ajustó el pH de las muestras con una solución de NaOH 1N a un pH de 8-10 y se incubaron por alrededor de 15 minutos. Se procedió a preparar asépticamente las muestras en cubetas desechables siguiendo las indicaciones que acompañaban al ensayo

bioenzimático. Una vez preparadas las muestras se midió la absorbancia de las mismas utilizando un espectrofotómetro (Back Scientific 100 Vis Spectrophotometer, Model 6300, Serial Number: 6370). El por ciento de ácido láctico en las muestras se determinó utilizando el valor de absorbancia junto a unas formas estereo-isoméricas. Este proceso se llevo a cabo por duplicado para cada una de las bebidas fermentadas durante las tres repeticiones.

• **Recuento de Bacterias Lácticas**

La población de bacterias lácticas fueron enumeradas por métodos descrito por Marshall (Marshall, R. T. 1992). Este método se llevo a cabo antes de iniciar la fermentación (0h) y al finalizar la fermentación cuando las distintas bebidas fermentadas alcanzaron un pH de 4.4. Antes de iniciar la fermentación se realizaron diluciones seriadas de 10^{-4} a 10^{-6} para cada una de las bebidas fermentadas. Se transfirió 1.0 ml de cada dilución a placas Petri a las cuales se les añadió el medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe “MRS” utilizando la técnica de vertido en plato. Platos duplicados de cada dilución fueron preparados y colocados en una jarra anaeróbica a las cuales se les colocaban absorbedores de oxígeno o “Gas Pack™” (BD BBL™ Gas Pack™ Plus Anaerobic System Envelopes with Palladium Catalyst, Bacton, Dickinson and Company) e indicadores anaeróbicos (BBL™). Una vez cerrada la jarra anaeróbica fue colocada en una incubadora (Isotemp Incubator, Fisher Scientific) por 48 horas a una temperatura de $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Al cabo de las 48 horas se contabilizó el número de colonias de los platos usando un contador de colonias (Bantex Colony Counter, Model 920A). Una vez

finalizada la fermentación de las bebidas fermentadas se llevo acabo el mismo método con la única excepción de que se realizaron diluciones seriadas de 10^{-5} a 10^{-7} .

• **Análisis de Ácidos Orgánicos y Compuestos Volátiles**

Para determinar la compuestos volátiles y ácidos orgánicos de las bebidas fermentadas se utilizó la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME, por sus siglas en inglés) (Pawliszyn, 1999; Ueda, K., et. al, 1990) y el instrumento cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS, por sus siglas en inglés) para la separación e identificación de los compuestos.

Para el análisis extractivo se utilizó la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME), donde se empleó una fibra bi-polar, 2cm-50/30 μ m, hecha de Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/Carboxen/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Después de acondicionada por una hora a 270 °C, la fibra fue colocada en el inyector del cromatógrafo de gas (GC modelo 6890 de la compañía Hewlett Packard) con una columna no polar BP1 (Fase estacionaria) 100% dimetilpolisiloxano (SGE, part. No. 054047, Texas, USA) de 25 metros de largo, 0.22 mm (diámetro interno y un espesor de película de 0.25 μ m).

Se corrieron estándares de acetoin, acetaldehído y etanol. Muestras de las bebidas fermentadas fueron almacenadas en tubos de ensayos con tapa de rosca y colocadas en una gradilla a una temperatura de -20 °C en un congelador (GETM) hasta que fueron analizadas. Las mismas fueron descongeladas justo antes de llevar a cabo el análisis. Se pesó 10.0000 ± 0.010 g de cada una de ellas en una balanza analítica (Modelo LA-110), y se colocaron en envases de 40 mL (*Clear vial*, part. No. 27184, Supelco, Bellefonte, PA,

USA) con tapa plástica de rosca y septo de teflón (*White faced*, 20mm de diámetro, 0.125” de espesor, part. No. 2637505, Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Una vez preparada las muestras, los envases se colocaron en un baño de recirculación (Modelo RM6 de la compañía Brinkman MGW Lauda), a una temperatura de 85 °C. Inmediatamente después, el septo de la tapa fue perforado con una aguja de acero inoxidable anexada a un microprocesador de temperatura de la compañía Omega Engineering, Inc. (Modelo HH21), para medir la temperatura de la fracción volátil de la muestra. Cuando el espacio de cabeza “headspace” alcanzó una temperatura de constante de 85 °C se perforó nuevamente el septo con la aguja del dispositivo manual del SPME y se expuso la fibra (empujando el émbolo hacia abajo) en el espacio de cabeza de la muestra por treinta minutos.

Al cabo de los treinta minutos luego de la extracción de los compuestos volátiles por parte de la fibra, esta se retiró del envase para ser introducida al inyector del GC/MS. El inyector estuvo equipado con una camisilla de vidrio, “*liner*” de 0.75 mm de diámetro interior (Inyección SPME, part. No. 2637505, Supelco, Bellefonte, PA, USA) y un septo (Thermogreen LB-2, Supelco, Bellefonte, PA, USA), operado a modo de inyección “*splitless*” a 220 °C con presión constante de 8 psi y un tiempo de purga de 5 minutos. La temperatura del cromatógrafo estuvo a 40 °C por 5 min. y luego una rampa de 10 C/min hasta 220 °C por 5 minutos. Los parámetros del espectrómetro de masas (MS), (Modelo 5973 de la compañía Hewlett-Packard) eran un sistema de ionización por impacto de electrones operado a 70 eV, a temperatura de cámara de ionización de 250 °C, a razón de barrido de intervalo de masa de 35 a 350 uma, y operado con un analizador másico

cuadrupolar, con el programa HP-Chem, Enhanced Chemstation, versión 4.03.00-1996 de la compañía Hewlett Packard.

Una vez transcurrido el tiempo de desorción optimizado, se retrajo la fibra y se retiró el dispositivo SPME del equipo. El detector, junto con el programa de la computadora, generó un cromatograma con una serie de picos o compuestos identificados en cada muestra. El cromatograma, también llamado cromatograma de iones totales (CIT) es una gráfica o espectro de masa de la función de la abundancia versus tiempo de elusión o tiempo de retención de cada compuesto de la muestra. Se compararon los espectros de masa correspondientes a cada uno de los componentes que se observaron en los cromatogramas reconstruidos de cada muestra (CIT) con los espectros del banco de datos de los programas de la biblioteca electrónica de espectros de masa en formato CD-ROM, *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6^{ta} edición, 1998 de 230,000 compuestos y *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 7^{ma} edición, 2003 de 390,000 compuestos de la compañía *Palisade Corporation*, USA.

• **Análisis Sensorial**

Se hizo una prueba de análisis sensorial a las bebidas fermentadas con el propósito de determinar si los panelistas detectaban diferencias entre las formulaciones. Se utilizó una prueba de diferencia general llamada Dos-de-Cinco. Las bebidas fermentadas que se analizaron fueron las elaboradas con 100% Leche y 75% Leche / 25% Suero. Se les pidió a los panelistas que probaran cinco muestras y que escogieran cuales eran las dos muestras iguales entre sí. Las muestras estaban aleatoriamente rotuladas con cifras de

tres dígitos. En esta prueba participaron 20 panelistas de la población de estudiantes y empleados del Colegio de Ciencias Agrícolas (Meilgaard, et. al, 1991).

- **Análisis Estadístico**

Todos los datos adquiridos para análisis estadístico fueron evaluados utilizando el programado InfoStat® (Versión 2006e.1). Según la complejidad de la investigación, los datos fueron clasificados como un diseño de bloque completamente aleatorizado y se analizaron mediante pruebas de análisis de varianza, regresión lineal simple y Tukey.

Resultados y Discusión

• Análisis de pH

El pH de las bebidas fermentadas al inicio de la fermentación (0 hora) fluctuaba entre 6.6 a 6.8 (Cuadro 1), debido a que el suero ácido (pH 4.6) incorporado en las distintas formulaciones fue neutralizado con el propósito de permitir la fermentación de las bacterias ácido lácticas. Al finalizar la fermentación que tomó alrededor de veinticuatro horas, el pH de las bebidas fermentadas fluctuaba entre 4.38 a 4.48 (Cuadro 1), esto nos sugiere de que sí ocurrió producción de ácido láctico por parte de las bacterias lácticas ya que se redujo el pH de las leches fermentadas. Corrieu, et. al, (2002) indica que en la preparación de leches fermentadas, el tiempo de fermentación para alcanzar un pH de 4.5 es sobre de veinte horas que es similar al tiempo que tomaron las bebidas fermentadas bajo las condiciones de este estudio.

La formulaciones más ácidas al final de la fermentación fueron la de 100% Leche y 75% Leche / 25% Suero mientras que la menos ácida fue la de 100% Suero, lo cual indica que el pH de las muestras varió de acuerdo a la cantidad de suero añadido (Cuadro 1). Al realizar un modelo matemático que estimó un $R^2 = 0.68$ para el pH al inicio de la fermentación, podemos observar que el pH disminuye a medida que aumenta la cantidad de suero en las fomulaciones. Este resultado era lo que esperábamos al incorporar el suero a las bebidas fermentadas.

Una vez finalizada la fermentación se encontró una relación inversa entre la cantidad de suero añadido y el pH obtenido ($P > 0.05$) (Cuadro 1) donde observamos que a mayor cantidad de suero añadido menor es el pH de la bebida fermentada. En parte esto se debe a que el contenido de azúcares presentes en el suero es menor que en la leche. La

otra razón se debe a que las bacterias lácticas son las responsables de llevar a cabo la fermentación de azúcares en las bebidas fermentadas, por tal razón las bebidas que contengan mayor contenido de azúcares en su composición van hacer más ácidas.

El cambio en pH demostró una relación lineal de ($P < 0.05$) (Cuadro 1) que a medida que aumentó la concentración de suero en la formulación disminuyó el cambio en pH. Esto significa que desde el principio hasta finalizar la fermentación el cambio en pH fue significativo para la bebida fermentada de 100% Suero en comparación a las de 75% Leche / 25% Suero y 100% Leche.

Al realizar el análisis estadístico sobre las diferencias en pH entre las distintas bebidas fermentadas, se encontró que el pH al inicio de la fermentación (Cuadro 1), la formulación de 75% Leche / 25% Suero fue la que obtuvo el pH más bajo entre el resto de las bebidas fermentadas. También encontramos que para el pH al inicio de la fermentación, hubo diferencias significativas entre la bebida fermentada de 100% Suero y la de 100% Leche. Sin embargo, para el pH al final de la fermentación no se encontró ninguna diferencia significativa entre las bebidas fermentadas. Para el cambio en pH se encontró diferencias significativas con las formulaciones de 100% Leche y 75% Leche / 25% Suero en comparación con la bebida fermentada de 100% Suero. Lo que esto significa que en ambas bebidas la actividad fermentativa de las bacterias fue más acelerada al comparar con las otras bebidas fermentadas.

El pH es un factor importante que puede afectar grandemente la calidad de un producto fermentado durante el proceso de fermentación (Athanasiadis, et. al, 2004). En un trabajo realizado por Athanasiadis demostró que el pH final del kéfir esta relacionado con el tiempo de fermentación de las azúcares, los niveles de dióxido de carbono y los

compuestos volátiles formados durante fermentación de las bebidas como el kéfir (Athanasiadis, et. al, 2004).

Cuadro 1: Valores promedio de pH y desviación estándar de las distintas bebidas fermentadas

pH			
Formulación	0 Horas	24 Horas	Δ pH
100% Leche	6.80 ± 0^b	4.39 ± 0.08^a	2.41^b
75% L / 25% S	$6.73 \pm 0.02^{a,b}$	4.38 ± 0.09^a	2.35^b
50% L / 50% S	$6.70 \pm 0.02^{a,b}$	4.43 ± 0.06^a	$2.27^{a,b}$
25% L / 75% S	$6.65 \pm 0.05^{a,b}$	4.44 ± 0.11^a	$2.21^{a,b}$
100% Suero	6.60 ± 0.10^a	4.48 ± 0.07^a	2.12^a

^{a, b} Supercritos diferentes en una misma columna difieren $p < 0.05$

• Acidez Titulable

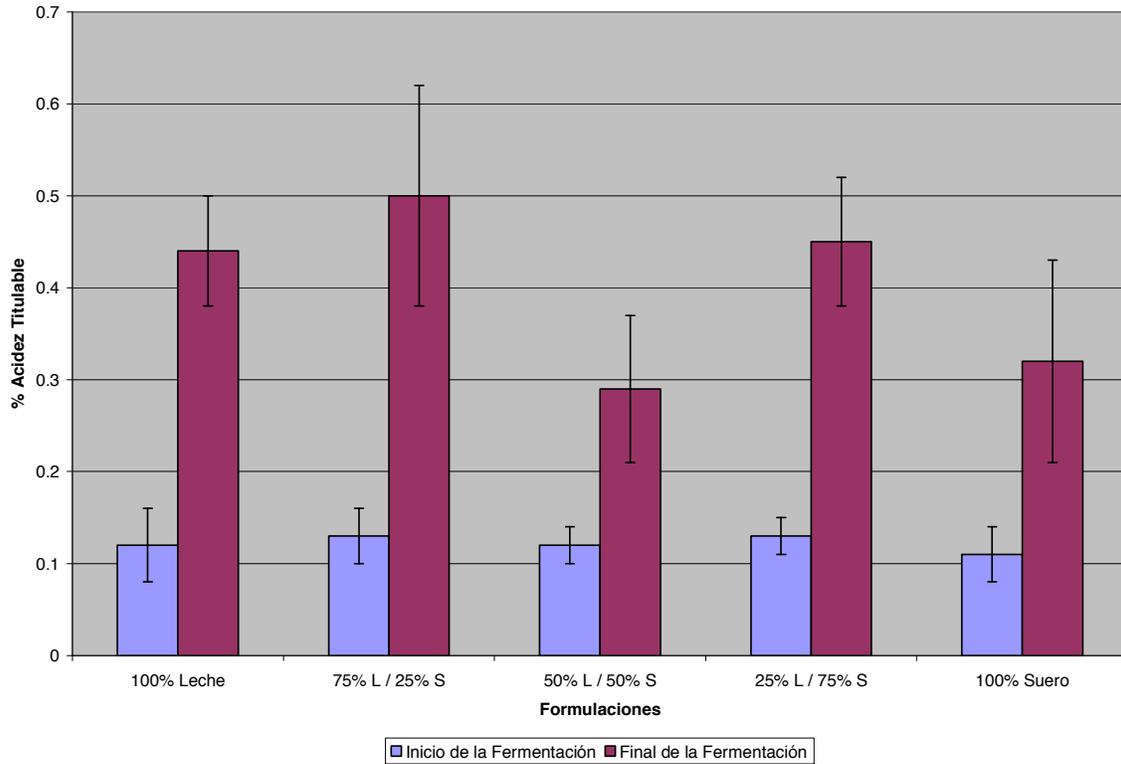
La acidez titulable es una medida de la cantidad de ácido láctico producido en la leche durante la fermentación. La acidez titulable y el pH exhiben una correlación débil. Pero cuando inicia la producción de ácido, la acidez titulable aumenta proporcionalmente, mientras que el pH disminuye (Walstra, 1999). Esto se debe a la fermentación láctica propiciada por las bacterias (lactóbacilos) presentes durante la elaboración de las bebidas fermentadas.

A las distintas bebidas fermentadas se les midió la acidez titulable con el propósito determinar indirectamente la actividad fermentativa de las bacterias lácticas durante el transcurso de la fermentación. La acidez de las bebidas fermentadas al inicio de la fermentación fluctuó entre 0.11 – 0.13%, la cual es la acidez normal de la leche fresca. Al finalizar la fermentación, la acidez titulable de las bebidas fermentadas fluctuó entre 0.29 – 0.50% (Figura 1).

Al realizar un análisis estadístico sobre las diferencias entre las bebidas fermentadas a través de los muestreos se encontró que para la acidez titulable al inicio de la fermentación, al final de la fermentación y para el cambio en acidez titulable no se encontraron diferencias significativas entre las bebidas fermentadas. Estos resultados demuestran que las bebidas fermentadas tuvieron actividad fermentativa similar. Este resultado era lo que esperábamos, que no hubiera ningún tipo de cambio significativo entre las distintas bebidas fermentadas durante el proceso fermentativo.

Klupsch, (1984) reportó que durante la fermentación del kefir el pH fue de 4.4 después de 18 horas a 25 °C hasta 28 °C y la acidez titulable fue de 1.01% con una adición de 0.4% de glucosa. En el presente estudio el pH fluctuó de 4.38 hasta 4.48 por alrededor de 24 horas y la acidez titulable de 0.29 – 0.50% sin la adición de glucosa para las bebidas fermentadas. La adición de glucosa a una bebida fermentada provee una fuente adicional de sustrato que las bacterias utilizan para producir más ácido láctico y por lo tanto, contribuye a disminuir el pH y aumentar la acidez titulable.

Figura 1: Valores de acidez titulable al inicio y al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas



Los corchetes en las barras representan valores de desviación estándar

• Composición Química de las Bebidas Fermentadas

Los sólidos totales en la leche al igual que en una bebida fermentada se componen de grasa, lactosa, proteínas y minerales. Existen diversos factores que afectan la composición físico-química y la calidad microbiológica de la leche. Dentro de esos factores se encuentra el ambiente (clima, humedad, temperatura, etc.), la alimentación, la desinfección e higiene ambiental al momento del ordeño, entre otras cosas. La leche fresca normalmente posee de un 12 a 13% de sólidos totales (Walstra, et. al, 1999).

Al finalizar la fermentación de las bebidas fermentadas se determinó el por ciento de sólidos totales. En el cuadro 2 podemos ver que las formulaciones con mayor cantidad de sólidos totales en su composición fueron la de 100% Leche (11.2% ST) y 75% L / 25% S (9.6% ST). También podemos observar, que a medida que se aumentó la cantidad de suero en las distintas formulaciones disminuyó la cantidad de sólidos totales. Este resultado era lo que esperábamos que sucediera al aumentar la cantidad de suero. Esto se debe a que la cantidad de sólidos totales del suero es mucho menor que el de la leche. El suero al ser un sub-producto de la elaboración del queso, retiene alrededor del 50% de los nutrientes de la leche, mientras que el resto de los sólidos totales permanece en el queso.

Se realizó un modelo matemático que estimó un $R^2 = 0.97$ para los sólidos totales de las distintas formulaciones. Lo que este análisis demostró fue que a medida que se aumentó la cantidad de suero a las formulaciones disminuyó la cantidad de sólidos totales en estos.

En el análisis sobre las diferencias entre las bebidas fermentadas se encontró que para los sólidos totales (Cuadro 2) hubo diferencias significativas para todas las bebidas fermentadas. En el cuadro 2 observamos, que a medida que se aumentó la cantidad de

suero que se añadió a las bebidas fermentadas disminuyó el por ciento de sólidos totales. En parte esto se debe a que la composición del suero es bien diferente al de la leche, por tal razón hay diferencias significativas bien marcadas entre las bebidas fermentadas.

Cuadro 2: Composición Química de las Bebidas Fermentadas

Componente	100% Leche	75% L / 25% S	50% L / 50% S	25% L / 75% S	100% Suero
% Sólidos Totales	11.20 ^e	9.60 ^d	8.20 ^c	6.70 ^b	5.30 ^a
% Grasa	3.15 ^c	2.54 ^c	1.70 ^b	1.16 ^b	0.27 ^a
% Proteína	2.92 ^c	2.20 ^{b,c}	1.75 ^{a,b,c}	0.87 ^{a,b}	0.71 ^a

La grasa de la leche juega un rol bien importante en las propiedades estructurales de la mayoría de los productos lácteos. En adición es un componente crítico en la mayoría de los productos lácteos, éstas a su vez disfrutan de un amplio uso como ingrediente por que imparten a las comidas propiedades altamente deseables (Pilhofer, et. al, 1994). Algunos de los atributos funcionales comúnmente asociados a la grasa de la leche son el sabor y las propiedades físicas de firmeza, dispersidad y lubricidad. Estos atributos funcionales que las grasas de la leche imparten a un alimento dependerán de la aplicación que se le de al producto (Kaylegian, 1994).

Si observamos el cuadro 2 podemos observar que las formulaciones con un mayor por ciento de grasa fueron las de 100% Leche / 0% Suero (3.15% grasa) y la de 75% Leche / 25% Suero (2.54% grasa).

El yogurt es un producto fermentado, pero antes de añadirle saborizantes este posee no menos de 3.25% de grasa láctea (Trachoo, 2002). La leche en Puerto Rico debe

contener un mínimo de 3.25% de grasa para cumplir los requisitos de ley. Según los resultados de este estudio la proporción de 100% Leche / 0% Suero (3.15% grasa) posee un por ciento de grasa similar a la leche fresca regular y a un yogurt entero (3.25% grasa). De acuerdo a la literatura el suero posee alrededor de 0.3% de grasa. (Athanasiadis, et. al, 2002), que es un valor similar al obtenido en la bebida fermentada con 100% Suero (0.27%).

Al realizar un análisis de regresión lineal se encontró un modelo matemático que estimó un $R^2 = 0.96$ para el por ciento de grasa de las bebidas fermentadas. Lo que esto significa que a medida que se aumentó la cantidad de suero en las distintas bebidas fermentadas disminuyó el por ciento de grasa. En parte esto se debe a que la leche (3.1% grasa) utilizada en este estudio poseía mayor por ciento de grasa en su composición que el suero (0.1% grasa) utilizado. Por tal razón las bebidas fermentadas con menor por ciento de suero van a tener mayor por ciento de grasa en su composición, esto es una relación directamente proporcional.

En el análisis sobre las diferencias entre las bebidas fermentadas encontramos que para el por ciento de grasa hubo diferencias significativas entre las formulaciones. En el cuadro 2 podemos observar que la proporción de 100% Suero es significativamente diferente del resto de las bebidas fermentadas por su bajo contenido en por ciento de grasa. Las proporciones de 100% Leche y 75% Leche / 25% Suero no son significativamente diferentes entre si, al igual que las proporciones de 50% Leche / 50% Suero y 25% Leche / 75% Suero. Al observar el cuadro 2 podemos ver que se da el mismo acontecimiento que ocurre en los sólidos totales, que a medida que se aumentó la cantidad de suero en las formulaciones, disminuyó el por ciento de grasa.

Las proteínas son compuestos químicos muy complejos que sirven como ingredientes en los alimentos. Como ingredientes, estas brindan funciones de estabilidad, volumen y estructura a los alimentos (Fernández-Martín, 1972). Las proteínas de la leche son bien conocidas por su alto valor nutricional y por la versatilidad de sus propiedades funcionales en los productos lácteos (De Wit, 1998)

Al observar el cuadro 2 podemos observar que las formulaciones con mayor porcentaje de proteína en su composición fueron las de 100% Leche (2.92% proteína) y la de 75% Leche / 25% Suero (2.20% proteína). Renner y Renz-Shaven (1986) en su estudio sobre los valores nutricionales y la composición química del kéfir reportaron que éste posee alrededor de 3.3% de proteína en su composición. La leche fresca de vaca al igual que el kéfir posee alrededor de 3.3% de proteína. Según los resultados de este estudio la formulación de 100% Leche (2.92% proteína) posee casi el mismo porcentaje de proteína que la leche fresca y el kéfir (3.3% proteína).

Al realizar un modelo matemático que estimó un $R^2 = 0.77$ para el porcentaje de proteína de las bebidas fermentadas. Lo que este análisis demostró es que a medida que se aumentó la cantidad de suero a las distintas formulaciones de las bebidas fermentadas disminuyó el porcentaje de proteína. Esto se debe a que la composición físico-química del suero posee menor cantidad de sólidos totales, porcentaje de grasa y proteína que la leche fresca de vaca. Por tal razón, las formulaciones con mayor cantidad de leche en su composición van a tener mayor porcentaje de proteína.

Se realizó un análisis estadístico donde se encontró que hubo diferencias significativas en el porcentaje de proteínas para las bebidas fermentadas. En el cuadro 2, podemos ver que la formulación de 100% Suero es significativamente diferente de las

bebidas fermentadas (100% Leche, 75% Leche / 25% Suero). También podemos observar que la bebida fermentada de 100% Suero es la de menor contenido de proteína.

- **Viscosidad**

La viscosidad es una medida de resistencia para el flujo de un fluido (Toledo, 1994). Los fluidos de alta viscosidad presentan mayor resistencia para fluir mientras que los fluidos de baja viscosidad fluyen con mayor facilidad. La fuerza con la que una capa de fluido en movimiento arrastra consigo a las capas adyacentes de fluido determina su viscosidad. La determinación de la viscosidad de un fluido se lleva a cabo mediante un equipo llamado viscosímetro (Toledo, 1994).

La viscosidad de un fluido es afectada por su temperatura. Es por eso que a mayor temperatura disminuye la viscosidad de los líquidos. Los líquidos, típicamente se consideran como fluidos incompresibles, lo que significa que tienen un volumen constante aún al ser sometidos a compresión (Toledo, 1994).

En términos generales, el comportamiento de la viscosidad se clasifica en dos grandes grupos: “Newtoniano” y “No Newtoniano”. La clasificación de un producto en estas categorías depende del valor del “índice de flujo” (n) en el modelo conocido como “Power Law”.

$$\tau = K\dot{\gamma}^n$$

En este modelo, cuando $n = 1$, el fluido se conoce como Newtoniano, de lo contrario, el fluido es No Newtoniano. Dentro de esta última categoría, se pueden diferenciar dos casos. Si $n < 1$, se conoce como un fluido pseudoplástico. Si, por el contrario, $n > 1$ se conoce como un fluido dilatante. El índice de flujo da una idea de

cómo se comporta el fluido al ser sometido a movimiento, es decir, si se va a mostrar más espeso o menos espeso con aumento en la velocidad de flujo.

El modelo “Power Law” también requiere la determinación del llamado índice de consistencia (K) para establecer la relación de viscosidad para un fluido en particular. Este índice ofrece una idea de cuán espeso es el producto cuando está en reposo.

El cuadro 3 presenta los valores de los índices para las distintas formulaciones bajo estudio. De aquí se pueden realizar varias observaciones.

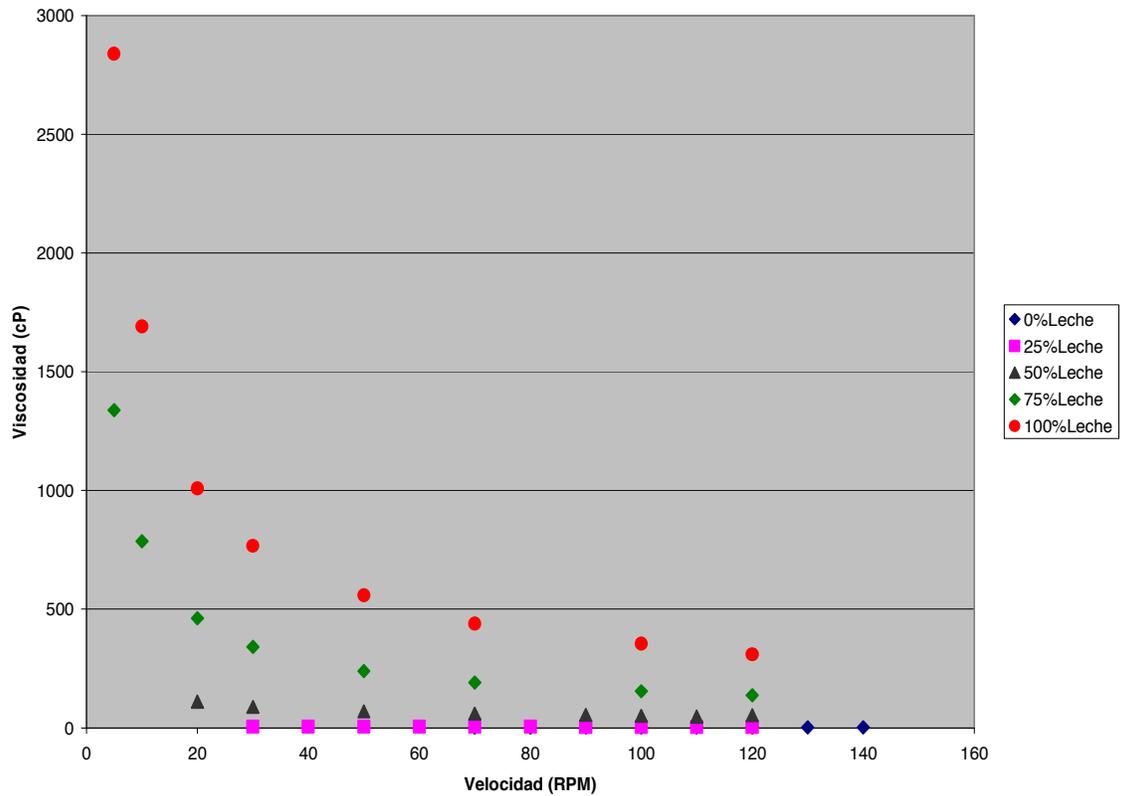
- Todas las bebidas presentaron un comportamiento pseudoplástico, excepto la formulación de 100% Suero, que presentó un comportamiento dilatante.
- El índice de flujo aumentó con la proporción de suero en la formulación. Debe recalarse que entre las formulaciones de 100% Leche y 75% Leche / 25% Suero, la diferencia entre los índices obtenidos no fue significativamente diferente ($\alpha = 0.05$).
- El índice de consistencia aumentó con la proporción de suero en la formulación. Esto no se cumplió para la formulación de 100% leche (0% Suero).

En el cuadro 2 se observó que las formulaciones con mayor cantidad de sólidos totales en su composición fueron las de 100% Leche y 75% Leche / 25% Suero; de igual manera ocurrió en la figura 2 donde podemos observar que las formulaciones más viscosas, en base al índice de consistencia, fueron las de 100% Leche y 75% Leche / 25% Suero.

Cuadro 3: Valores de n y K para las bebidas fermentadas

Formulación	n	K (Pa.s ⁿ)
100% Leche	0.2804	36.27
75% Leche / 25% Suero	0.2776	51.65
50% Leche / 50% Suero	0.3653	11.21
25% Leche / 75% Suero	0.7261	4.75
100% Suero	1.5750	0.0009

Figura 2: Valores de viscosidad al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas



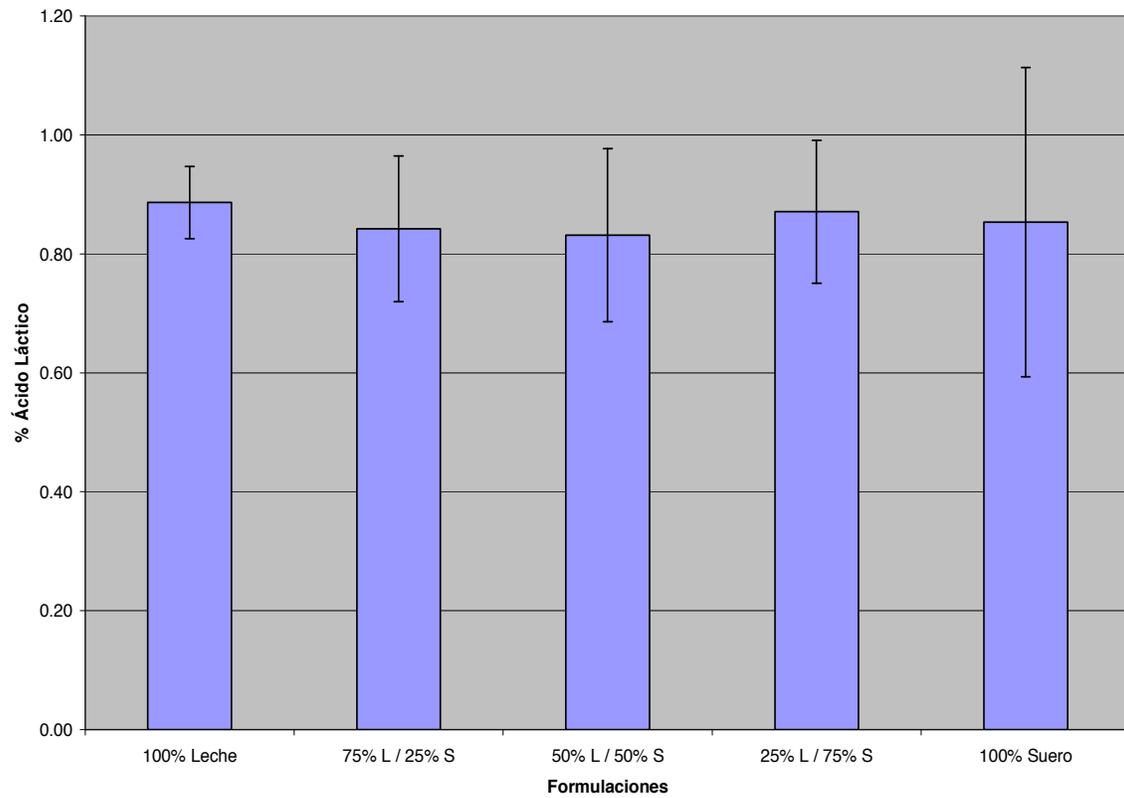
• **Ácido Láctico**

La producción de ácido láctico en una bebida fermentada como el kéfir se debe a una fermentación láctea, llevada a cabo por bacterias lácticas en condiciones anaeróbicas. Lo que ocurre durante esta fermentación es que las bacterias lácticas transforman la lactosa en ácido láctico. El ácido láctico producido por estas bacterias le confiere al kéfir ese sabor ligeramente ácido. Por tal razón el ácido láctico es un componente esencial en la mayoría de los productos lácteos fermentados.

El kéfir es una bebida fermentada que contiene entre 0.6% a 0.9% de ácido láctico (Libudzisz y Piatkiewicz, 1990). El yogurt es un producto fermentado, pero antes de añadirle saborizantes este posee no menos de 0.9% de ácido láctico (Trachoo, 2002). Para medir el por ciento de ácido láctico de las bebidas fermentadas se utilizó un ensayo bioenzimático. En la figura 3 se observa que las formulaciones con mayor por ciento de ácido láctico fueron las de 100% Leche (0.89% Ácido Láctico) y 25% Leche / 75% Suero (0.87% Ácido Láctico). El por ciento de ácido láctico de las bebidas fermentadas fluctuó entre 0.83% a 0.89%. Estos valores son similares a los obtenidos en investigaciones parecidas a esta por Libudzisz y Piatkiewicz, 1990 y Trachoo, 2002.

Al realizar un análisis de regresión lineal ($P > 0.05$) se encontró que no hubo diferencias significativas en el por ciento de ácido láctico entre las bebidas fermentadas. A finalizar la fermentación de las bebidas fermentadas no se encontraron diferencias significativas en pH, acidez titulable y el por ciento de ácido láctico, esto nos podría indicar que a pesar de las diferencias significativas en la composición de las formulaciones la actividad fermentativa fue similar.

Figura 3: Valores de ácido láctico al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas



Los corchetes en las barras significan valores de desviación estándar

• Análisis Microbiológico

Las distintas bebidas fermentadas fueron elaboradas con un cultivo iniciador de microorganismos (“Kefir Starter”, Body Ecology™, Decatur, GA), que según la literatura que acompañaba dicho producto, está compuesto de las bacterias lácticas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* y *Lactobacillus Kefyr* y de las levaduras: *Saccaromyces unisporus* y *Klyveromyces marxianus* var. *marxianus*. Las bacterias lácticas que contiene este cultivo iniciador se pueden clasificar en homofermentativas y heterofermentativas. Las bacterias homofermentativas (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*) son aquellas que producen ácido láctico como producto final del proceso de fermentación (Jay, 2003). Mientras que las bacterias heterofermentativas (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* y *Lactobacillus Kefyr*) producen ácido láctico más otros compuestos tales como ácido acético, dióxido de carbono y etanol (Jay, 2003).

Las bacterias lácticas del género *Lactococcus* contribuyen a una acidificación rápida de las distintas bebidas fermentadas durante las primeras horas de fermentación. Mientras que las bacterias lácticas del género *Leuconostoc* contribuyen al sabor peculiar de las bebidas fermentadas. Las bacterias lácticas son de suma importancia en la elaboración de una amplia gama de productos lácteos fermentados, ya sean líquidos como el kefir, o semisólidos y sólidos, como el yogurt y el queso.

Las levaduras presentes en el cultivo iniciador eran *Saccaromyces unisporus* y *Klyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *Saccaromyces unisporus*, esta es una levadura no fermentadora de la lactosa que produce alcohol y dióxido de carbono a partir de

glucosa. *Klyveromyces marxianus* var. *marxianus*, es una levadura fermentadora de lactosa que es responsable de la formación de dióxido de carbono y contribuye al sabor y aroma de las bebidas fermentadas (Simova, et. al, 2002).

El crecimiento inicial de bacterias lácticas en las distintas bebidas fermentadas fluctuó entre 6.60 a 6.10 Log CFU/mL y no hay diferencias significativas para estos valores (Figura 8). Esto indica que las distintas bebidas fermentadas comenzaron la fermentación con una cantidad similar de inóculo.

Mientras que al finalizar la fermentación la población de bacterias lácticas fluctuó entre 8.90 a 8.23 Log CFU/mL. En la figura 4 se observó que hay diferencias significativas en la población de bacterias entre la formulación de 100% Leche, 25% Leche y 75% Suero y 100% Suero.

La adición de un cultivo iniciador de bacterias lácticas a las distintas bebidas fermentadas contribuyó al desarrollo de sus características organolépticas. Para que dicho cultivo pudiera llevar acabo sus funciones en el proceso de elaboración de las distintas bebidas fermentadas necesitó de una rica fuente de alimento más unas condiciones anaeróbicas estrictas (Jay, 2003). Esa fuente de alimento, compuesta de proteínas, grasas, azúcares, vitaminas y minerales contribuyó al crecimiento y propagación del cultivo iniciador. Las bacterias presentes en el cultivo iniciador poseen una relación bien estrecha con el pH, la acidez y la fuente de alimento (sólidos totales) de las distintas bebidas fermentadas (Jay, 2003).

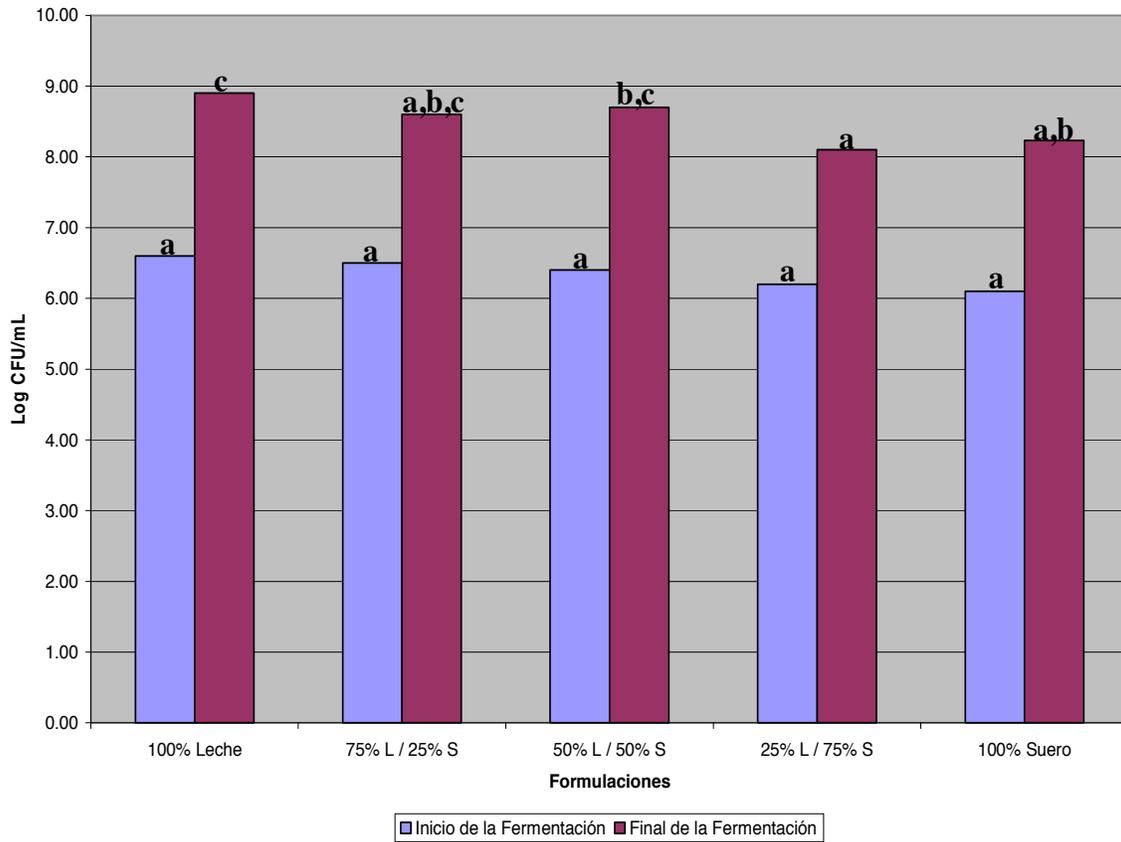
Las bacterias lácticas utilizan como fuente de alimento a la lactosa (azúcar de la leche) para convertirla en ácido láctico, donde dicho producto es responsable del sabor ácido de las distintas bebidas fermentadas (Koroleva, 1988). A medida que aumenta la

acidez en las distintas bebidas fermentadas disminuyó el pH, lo que significa que estos dos parámetros tienen una relación inversamente proporcional.

Según Jay (2003), un buen cultivo iniciador en una bebida fermentada convierte la mayoría de la lactosa en ácido láctico. Donde la acidez titulable de la bebida fermentada aumenta de 0.8 a 1.0%, calculada como ácido láctico, y el pH usualmente disminuyó de 4.3 a 4.5. Estos datos proporcionados por Jay (2003) concuerdan con los resultados de nuestro estudio donde observamos que el por ciento de ácido láctico en las distintas bebidas fermentadas fluctuó entre 0.83 a 0.89% y el pH disminuyó de 4.38 a 4.48. El cultivo iniciador utilizado en este estudio resultó ser efectivo porque cumplió en la elaboración de una bebida fermentada con las mismas características organolépticas de la bebida fermentada llamada kéfir (Athanasiadis, 2002, Corrieu, et. al, 2002, Jay, 2003, Klupsch, 1984, Libudzisz y Piatkiewicz, 1990 Renner y Renz-Shaven, 1986, Toledo, 1994).

En este estudio se trató de medir el crecimiento de levaduras durante el inicio y el final de la fermentación para las bebidas fermentadas. No obstante no pudimos aislarlas aun cuando se utilizaron dos métodos diferentes (Potato Dextrose Agar Acidificado a pH 3.5, PDA Petrifilms 3M). Aunque la literatura que acompaña el inóculo iniciador indica que hay levaduras se podría asumir que no se propagaron durante la fermentación.

Figura 4: Población de bacterias lácticas al inicio y al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas



a, b, c Supercritos diferentes en las columnas de la gráfica difieren $p < 0.05$

• Análisis de Ácidos Orgánicos y Compuestos Volátiles

Los cromatogramas de iones totales (CIT) de las distintas bebidas fermentadas demostraron que estas poseen un sin número de compuestos volátiles como lo demuestran las figuras de la 5 – 8. Sin embargo, los compuestos volátiles que se hallaron en mayor concentración en las bebidas fermentadas fueron; etanol a un tiempo de retención de 1.49 min, ácido acético a 2.43 y el 2,3-butanediol a 5.36 minutos. En el cuadro 4 podemos observar los diferentes compuestos volátiles presentes en la bebida fermentada de 100% Leche. También es evidente ver que el etanol (9.25%) está en mayor abundancia que el ácido acético (8.59%) y 2,3-butanediol (1.62%). Para la bebida fermentada de 75% Leche / 25% Suero el compuesto volátil con mayor abundancia es etanol (24.89%) seguido por ácido acético (13.81%) y 2,3-butanediol (1.10%) (Cuadro 6). Mientras que para la bebida fermentada de 50% Leche / 50% el compuesto volátil con mayor abundancia fue el ácido acético (21.82%) seguido por etanol (17.07%) y 2,3-butanediol (1.54%) (Cuadro 7). En el cuadro 8 podemos observar que el compuesto volátil con mayor abundancia en la bebida fermentada de 25% Leche / 75% Suero es el ácido acético (17.73%) seguido por etanol (11.15%). En esta bebida no se encontró la presencia del compuesto volátil 2,3-butanediol. Por último en la bebida fermentada de 100% Suero el compuesto volátil con mayor abundancia es el etanol (33.28%) seguido por el ácido acético (25.23%) y 2,3-butanediol (0.91%) (Cuadro 5).

La bebida fermentada que posee en mayor abundancia a los compuestos volátiles de etanol y ácido acético es la de 100% Suero. Mientras que la bebida fermentada de 100% Leche es la que posee en mayor abundancia el compuesto volátil de 2,3-butanediol.

Las distintas bebidas fermentadas contenían compuestos volátiles como ácido caprónico, ácido benzoico, ácido caprílico, ácido caprílico, ácido laurico, entre otros (Cuadros 4 – 8).

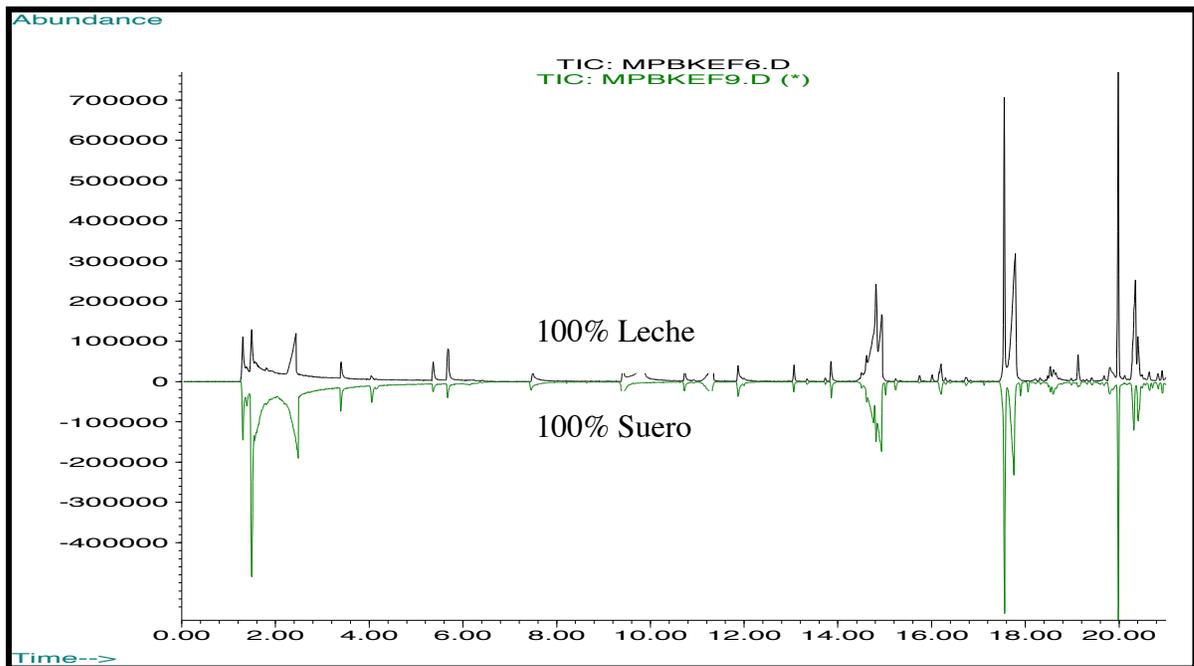
Estudios realizados a productos lácteos como el yogurt y el kéfir se ha encontrado que poseen compuestos volátiles como acetaldehído, diacetil y acetoín (Guzel-Seydim, 2000). Dichos compuestos volátiles son de suma importancia para estos productos lácteos porque les confieren su sabor peculiar. Durante el proceso de fermentación del kéfir se ha encontrado compuestos volátiles como acetaldehído, acetoín y etanol (Guzel-Seydim, 2000). Mientras que en el yogurt se ha encontrado compuestos volátiles como diacetil, acetoin, acetaldehído, butanal, 2,3-pentanedione y 3-heptanone. Los compuestos volátiles 2,3-pentadione y butanal le brinda olor al yogurt. Sin embargo los compuestos volátiles diacetil, acetoín y 3-heptanone les brinda a los productos fermentados un olor a fruta (Gallardo-Escamilla, et al., 2005).

En este estudio no se encontraron los compuestos volátiles de diacetil y acetaldehído en la composición de las distintas bebidas fermentadas. Si se encontraron compuestos volátiles como etanol, ácido acético, 2,3-butanediol, entre otros. El compuesto 2,3-butanediol es una forma oxidada de acetoín. Una posible explicación es que la composición de los granos de kéfir es completamente diferente al inóculo de kéfir que se utilizó en este estudio.

Cuadro 4: Componentes Volátiles de una Bebida Fermentada (100% Leche)

Compuesto	Formula	Peso Molecular	% Probabilidad	% Área Normalizada
Etanol	C ₂ H ₆ O	46.040	80	9.25
Ácido Acético	C ₂ H ₄ O ₂	60.021	86	8.59
2,3-Butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90.068	83	1.62
Ácido Capronico	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.084	72	3.94
Ácido Benzoico	C ₇ H ₆ O ₂	122.037	92	24.64
Ácido Caprilico	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.115	83	9.12
Ácido Caprico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.146	96	26.49
Ácido Laurico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.178	97	16.33

Figura 5: Cromatograma de iones totales (CIT) para las bebidas fermentadas de 100% Leche y 100% Suero



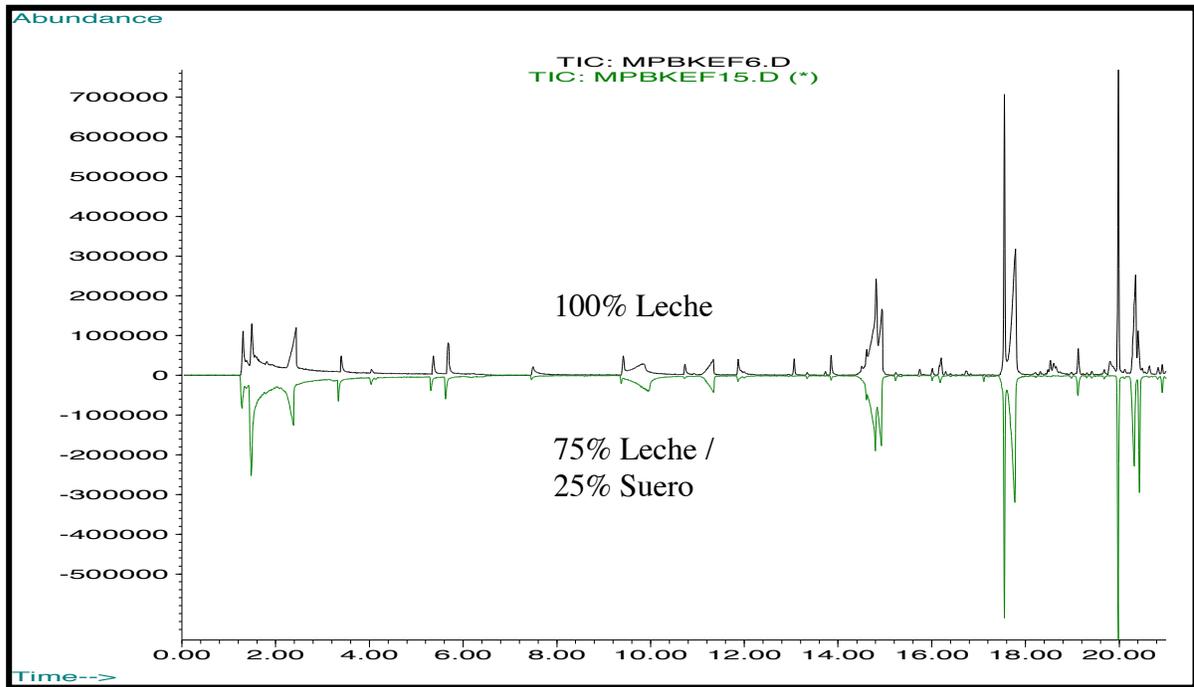
Cuadro 5: Componentes Volátiles de una Bebida Fermentada (100% Suero)

Compuesto	Formula	Peso Molecular	% Probabilidad	% Área Normalizada
Etanol	C ₂ H ₆ O	46.040	90	33.28
Ácido Acético	C ₂ H ₄ O ₂	60.021	78	25.23
2,3-Butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90.068	74	0.91
Ácido Capronico	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.084	78	2.62
Ácido Benzoico	C ₇ H ₆ O ₂	122.037	64	8.19
Ácido Caprilico	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.115	83	12.12
Ácido Caprico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.146	94	11.09
Piperonal	C ₈ H ₆ O ₃	150.13	64	2.45
Ácido Laurico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.178	99	3.41

Cuadro 6: Componentes Volátiles de una Bebida Fermentada (75% Leche / 25% Suero)

Compuesto	Formula	Peso Molecular	% Probabilidad	% Área Normalizada
Etanol	C ₂ H ₆ O	46.040	90	24.89
Ácido Acético	C ₂ H ₄ O ₂	60.021	78	13.81
2,3-Butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90.068	74	1.10
Ácido Capronico	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.084	83	3.74
Ácido Benzoico	C ₇ H ₆ O ₂	122.037	70	16.58
Ácido Caprilico	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.115	83	8.97
Ácido Caprico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.146	96	20.90
2H-Pyran-2-one	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170.25	90	1.38
Ácido Laurico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.178	97	8.64

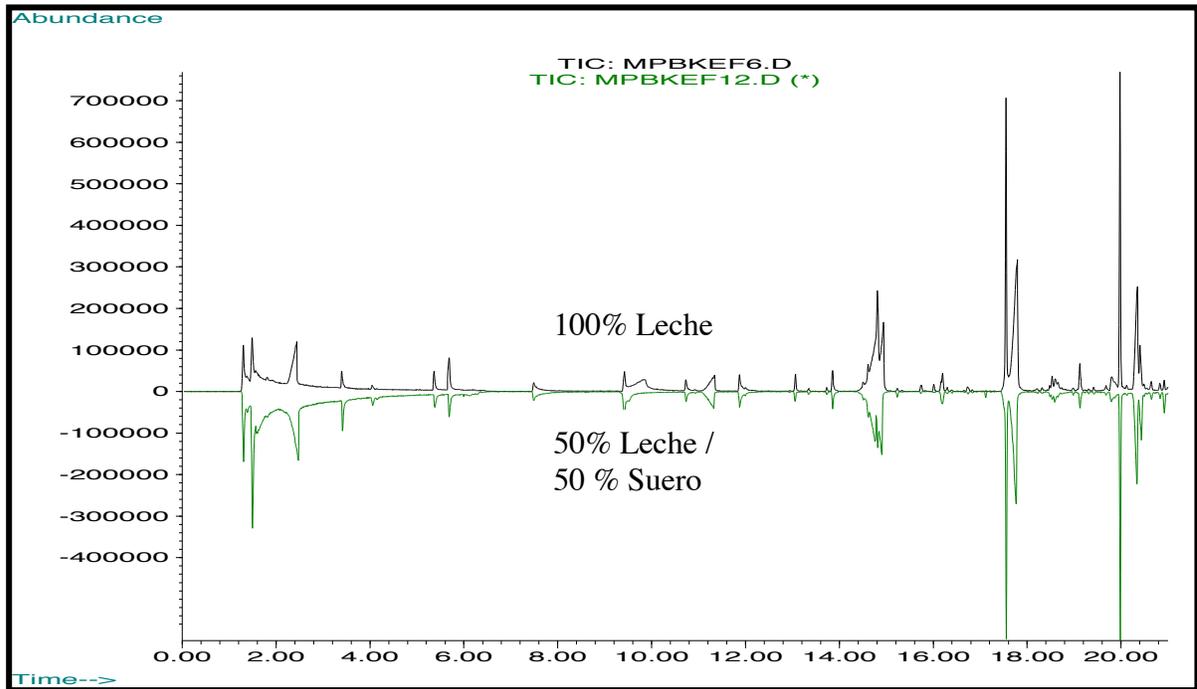
Figura 6: Cromatograma de iones totales (CIT) para las bebidas fermentadas de 100% Leche y 75% Leche / 25% Suero



Cuadro 7: Componentes Volátiles de una Bebida Fermentada (50% Leche / 50% Suero)

Compuesto	Formula	Peso Molecular	% Probabilidad	% Área Normalizada
Etanol	C_2H_6O	46.040	90	17.07
Ácido Acético	$C_2H_4O_2$	60.021	72	21.82
2,3-Butanediol	$C_4H_{10}O_2$	90.068	83	1.54
Ácido Caprónico	$C_6H_{12}O_2$	116.084	83	3.29
Ácido Benzoico	$C_7H_6O_2$	122.037	93	10.79
Ácido Caprílico	$C_8H_{16}O_2$	144.115	83	9.93
Ácido Capríco	$C_{10}H_{20}O_2$	172.146	91	15.33
Ácido Laurico	$C_{12}H_{24}O_2$	200.178	97	8.00

Figura 7: Cromatograma de iones totales (CIT) para las bebidas fermentadas de 100% Leche y 50% Leche / 50% Suero



Cuadro 8: Componentes Volátiles de una Bebida Fermentada (25% Leche / 75% Suero)

Compuesto	Formula	Peso Molecular	% Probabilidad	% Área Normalizada
Etanol	C_2H_6O	46.040	90	11.15
Ácido Acético	$C_2H_4O_2$	60.021	90	17.73
Ácido Caprilico	$C_8H_{16}O_2$	144.115	83	20.07
Ácido Caprico	$C_{10}H_{20}O_2$	172.146	96	35.92
Ácido Laurico	$C_{12}H_{24}O_2$	200.178	99	15.13

Figura 8: Cromatograma de iones totales (CIT) para las bebidas fermentadas de 100% Leche y 25% Leche / 75% Suero

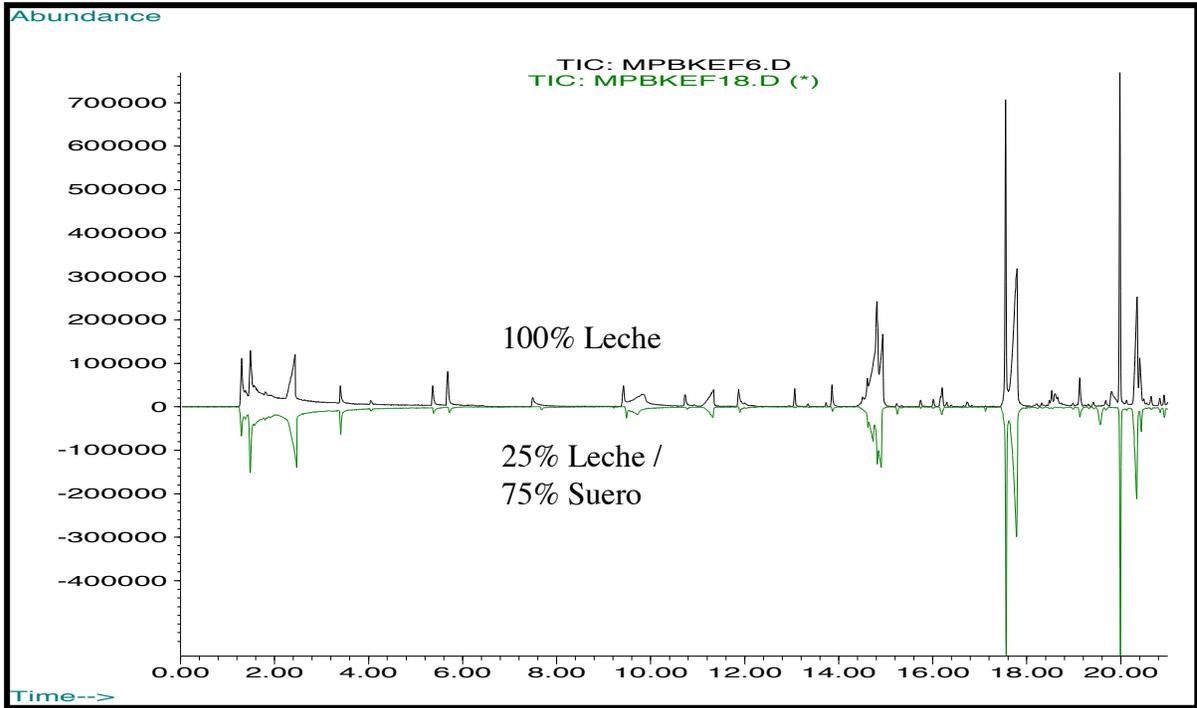
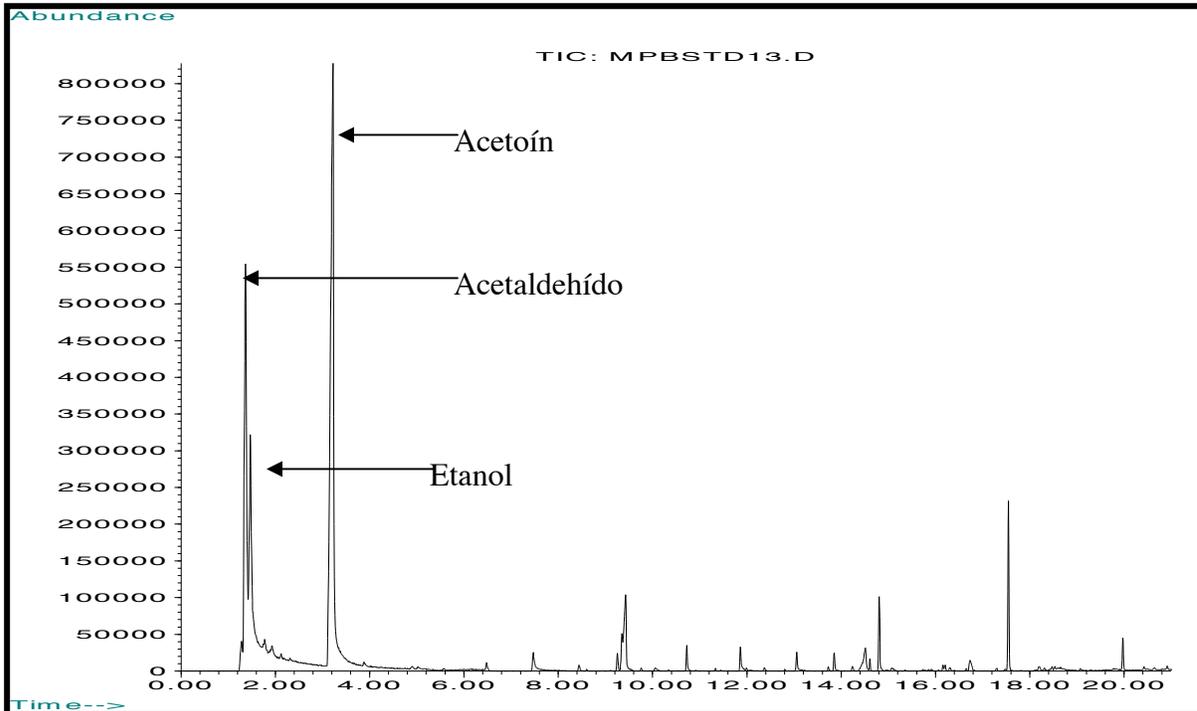


Figura 9: Estándares de los compuestos volátiles de acetoín, acetaldehído y etanol



• Análisis Sensorial

Para el análisis sensorial se realizó una prueba Dos-de-Cinco con las bebidas fermentadas elaboradas con 100% Leche / 0% Suero y 75% Leche / 25% Suero. La prueba Dos-de-Cinco es una prueba de discriminación donde la posibilidad de adivinar es baja (10%) en comparación con otras pruebas. Dado que, a juicio del experimentador, existían diferencias entre todas formulaciones, se decidió por ésta para tener mayor confianza en los resultados ya que la cantidad de panelistas disponibles era limitada.

La selección de estas dos formulaciones, se debió a que su apariencia física (color, textura) era similar a la del kéfir. La formulación de 50% Leche / 50% Suero era de color amarillento y su textura era semi-sólida. La formulación de 25% Leche / 75% Suero tenía color amarillo y en la superficie se observaba un sobrenadante de color blanco. Su textura era líquida. La formulación de 100% Suero era de color amarillo donde se observó en la superficie una gran cantidad de sobrenadante de color blanco. Estas diferencias en la apariencia, hicieron que se escogieran para la prueba sensorial, las formulaciones de 100% Leche y 75% Leche / 25% Suero.

El panel se llevó a cabo en las facilidades del Laboratorio de Leche y sus Productos del Departamento de Industria Pecuaria con veinte panelistas sin adiestrar.

Los datos recopilados arrojaron que solamente tres panelistas pudieron identificar las muestras correctamente. Para poder rechazar la hipótesis nula de “No diferencia” se necesitaban cinco panelistas ($\alpha = 0.05$). Con este resultado es posible concluir que, con 95% de confianza, la formulación de 75% Leche / 25% Suero es similar a la control (100% Leche) es decir, al kéfir comercial.

Conclusiones

En este estudio se cumplió con el objetivo principal el cual era elaborar una bebida fermentada a base de suero ácido y leche con el propósito de determinar si la utilización de este sub-producto puede generar las características organolépticas de una bebida fermentada. La bebida fermentada de 100% Leche era el control en este estudio. Dicha bebida fermentada obtuvo casi las mismas características organolépticas que la bebida de kéfir. De acuerdo a la literatura la composición del kéfir es: Agua (87.5%), Grasa (3.3%), Proteína (3.3%), pH (4.2 – 4.6), Ácido Láctico (0.6 – 0.9%), Bacterias Lácticas (10^8 – 10^9). Mientras que la composición de la bebida fermentada de 100% Leche fueron: Agua (88.8%), Sólidos Totales (11.2%), Grasa (3.15%), Proteína (2.92%), pH (4.39), Ácido Láctico (0.89%), Bacterias Lácticas (10^8). Al comparar los resultados podemos observar que ambas bebidas son bastante parecidas según la literatura (Athanasiadis, et al., 2002, Corrieu, et. al, 2002, Jay, 2003, Klupsch, 1984, Libudzisz y Piatkiewicz, 1990 Renner y Renz-Shaven, 1986).

En cuanto a las bebidas fermentadas elaboradas con suero ácido y leche la que se asemeja al control (100% Leche) es la bebida fermentada de 75% Leche / 25% Suero. La características de esta bebida fueron: Agua (90.4%), Sólidos Totales (9.6%), Grasa (2.54%), Proteína (2.20%), pH (4.38), Ácido Láctico (0.84%), Bacterias Lácticas (10^8). Al analizar estos resultados podemos ver que la diferencia que existe entre esta bebida y el control, es que el control posee un poco más de sólidos totales, grasa, proteína y ácido láctico en su composición. De la misma manera ocurre con la viscosidad donde la bebida fermentada de 100% Leche es un poco más viscosa que la de 75% Leche / 25 Suero.

Ambas bebidas fermentadas se utilizaron en una prueba de análisis sensorial con el propósito de evaluar si los panelistas podían distinguirlas. El resultado de esta prueba fue que de veinte panelista solamente tres pudieron distinguir correctamente cual era la bebida fermentada que estaban probando, lo que significa que no hubo diferencia entre los dos tratamientos. Entre los comentarios que dijeron los panelistas, la mayoría dijo que las muestras que estaban probando eran iguales en apariencia y sabor donde no sabían cual era la diferencia existente. Según todos estos resultados se concluyó que se puede utilizar suero ácido en la elaboración de una bebida fermentada hasta una proporción de 25%.

Sin embargo, las otras bebidas fermentadas elaboradas con suero ácido encontramos las siguientes características. La bebida fermentada de 100% Suero era un segundo control en este estudio. Sus características fueron: Agua (94.7%), Sólidos Totales (5.3%), Grasa (0.27%), Proteína (0.71%), pH (4.48), Ácido Láctico (0.85%), Bacterias Lácticas (10^8). Para la bebida fermentada de 50% Leche / 50 % Suero sus características fueron: Agua (91.8%), Sólidos Totales (8.2%), Grasa (1.70%), Proteína (1.75%), pH (4.43), Ácido Láctico (0.83%), Bacterias Lácticas (10^8). Mientras que para la bebida fermentada de 25% Leche / 75% Suero sus características organolépticas fueron: Agua (93.3%), Sólidos Totales (6.7%), Grasa (1.16%), Proteína (0.87%), pH (4.44), Ácido Láctico (0.87%), Bacterias Lácticas (10^8).

A medida que se aumenta la cantidad de suero ácido a las distintas bebidas fermentadas disminuye la cantidad de sólidos totales, grasa, proteína, acidez y la viscosidad, mientras que aumenta la cantidad de agua y ácido láctico. El aumento de suero ácido en las distintas bebidas fermentadas disminuye los sólidos totales, grasa y las

proteínas lo cual disminuye su valor nutricional para el consumidor. También disminuye la viscosidad y aumenta el contenido de agua lo cual es la mayor limitación para elaborar una bebida fermentada. Debido al alto contenido de agua del suero se observó que el inóculo de kéfir se quedó completamente aglomerado en la superficie de la bebida fermentada lo que lo hizo poco atractivo y posiblemente no entraría con la aceptación del consumidor.

Las distintas bebidas fermentadas poseían en mayor abundancia los compuestos volátiles de etanol, ácido acético y 2,3-butanediol. Los valores de los compuestos volátiles para la bebida fermentada de 100% Leche fueron: etanol (9.25%), ácido acético (8.59%) y 2,3-butanediol (1.62%). Mientras que para la bebida fermentada de 75% Leche / 25% Suero fueron: etanol (24.89%), ácido acético (13.81%) y 2,3-butanediol (1.10%). Estos resultados demuestran que un leve aumento de suero en una bebida fermentada aumenta los compuestos volátiles de etanol y ácido acético. La bebida fermentada que poseía en mayor abundancia los compuestos volátiles de etanol (33.28%) y ácido acético (25.23%) fue la de 100% Suero. Mientras que la bebida fermentada de 100% Leche poseía en mayor abundancia el compuesto volátil de 2,3-butanediol (1.62%). El compuesto volátil de 2,3-butanediol es una forma oxidada de acetoin. Los productos fermentados como el yogurt y el kéfir poseen en común compuestos volátiles como acetaldehído, diacetil y acetoin. En nuestras bebidas fermentadas no encontramos dichos compuestos pero si encontramos los mencionados anteriormente entre otros.

Se concluye que se puede utilizar el suero ácido en la elaboración de una bebida fermentada en una proporción limitada con las mismas características organolépticas que la bebida de kéfir. El suero ácido posee un gran potencial para la elaboración de una

bebida fermentada y a su vez es una buena alternativa para la industria lechera que poseen un gran problema a la hora de comercializar este subproducto.

Recomendaciones

- ▶ Utilizar estabilizadores para mejorar la textura de aquellas bebidas fermentadas con 50% o más de suero.
- ▶ Realizar un estudio comparativo entre los cultivos comerciales de kefir y auténticos gránulos de kéfir para determinar si hay diferencias entre los compuestos orgánicos obtenidos durante la fermentación.
- ▶ Estandarizar la composición química de la bebida fermentada para evitar fluctuaciones en el producto.
- ▶ Utilizar saborizantes para mejorar la aceptación del consumidor.

Bibliografía

Association of Official Analytical Chemistry. 1995. Official methods of analysis of the AOAC. 16 th Ed. Arlington, VA.

Athanasiadis, I.; Boskou, D.; Kanellaki, M.; Kiosseoglou, V.; Koutinas, A. 2002. A whey liquid waste of dairy industry as raw material for potable alcohol production by kefir granules. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7231 – 7234.

Athanasiadis, I., A. Paraskevopoulou, G. Blekas and V. Kiosseoglu. 2004. Development of novel whey beverage by fermentation with kefir granules. Effect of various treatments. *Biotech. Prog.* 20:1091-1095.

Banavara, D. S., Anupama, D. and Rankin, S. A. 2003. Studies on physicochemical and functional properties of commercial sweet whey powders. *J. Dairy Sci.* 86: 3866 – 3875.

Ben – Hassan, R. M.; Ghaly, A. E. 1994. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* I cheese whey for pollution potential production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47, 89 – 105.

Bonadé, A., Murelli, F., Vescovo, M. and Scolari, G. 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Letters in App. Micro.* 33: 153 – 158.

Boor, KJ. 2001. ADSA Foundation Scholar Award. Fluid dairy product quality and safety: Looking to the future. *J. Dairy Sci.* 84: 1 – 11.

Britz, J., Schoevers, A. 2003. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. *Society of Dairy Technol.* Vol. 56, No 3.

Castillo, F. J. 1990. Lactose metabolism by yeasts. In *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, 1st ed.; Verachtert, H., De Mont, R., Eds.; Dekker: New York, pp 297 – 320.

Cavadini C, Siega–Riz AM, Popkin BM. 2000. US adolescents' food intake trends from 1965 – 1996. *Arch. Dis. Childhood*; 83: 18 – 24.

Corrieu, G., Remeuf, F., Oliveira, M. N., Lucas, A., Sodini, I. 2002. Effect of Milk Base and Starter Culture on Acidification, Texture, and Probiotic Cell Counts in Fermented Milk Processing. *J. Dairy Sci.* 85:2479 – 2488.

De Wit, J. N. 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.* 81:597 – 608.

Farnworth, E.R., Mainville, I. and Arcand, Y. 2003. Buffering capacity of milks products in an *in vitro* upper gastrointestinal tract model. Canadian Federation of Biological Societies, 46 Annual Meeting, Ottawa, June 12 – 14. Abstract # F065A

Fernández-Martín, F. 1972. Influence of temperature and composition on some physical properties of milk and milk concentrates. II. Viscosity. *J. Dairy Res.* 39:75.

Gallardo-Escamilla, F. J., Kelly, A. L. and Delahunty, C. M. 2005. Influence of starter culture on flavor and headspace volatile profiles of fermented whey and whey produced from fermented milk. *J. Dairy Sci.* 88: 3745 – 3753.

Gruetzmacher, T. J., and Bradley, Jr. R. L. 1991. Acid whey as a replacement for sodium caseinate in spray – dried coffee whiteners. *J. Dairy Sci.* 74: 2838 – 2849.

Guimaraes, W. V.; Dudey, G. L.; Ingram, L.O. 1992. Fermentation of sweet whey by ethanogenic. *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 41 – 45.

Güven A. and Gülmez M. 2003. The effect of kefir on the activities of gsh-px, gst, cat, gsh and lpo levels in carbon tetrachloride-induced miced tissues. *J. Vet. Med. B* 50, 412 – 416.

Guzel-Seydim, Z., Seydim, A. C. and Greene A. K. 2000. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *J. Dairy Sci.* 83: 275 – 277.

Heller, Knut J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 374 – 379.

Hertzler, S.R. and Clancy, S.M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J. Am. Diet. Assoc.* 103: 582 – 587.

Jamuna, M., and Jeevaratnam, K. 2004. Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocin. *J. Gen. App. Micro.* 50: 79 – 90.

Jay, J. M. 2003. *Modern Food Microbiology*. Chapter 7: Fermentation and Fermented Dairy Products. 6 th Ed. pp 113 – 128.

Jelen, P. 1992. Whey: composition, properties, processing and uses. In *Encyclopedia of Food and Technology*; Hoi, Y.H., Ed.; John Wiley and Sons: New York, pp 2835 – 2845.

Kaylegian, K. E. 1994. Functional characteristics and nontraditional applications of milk lipid components in food and nonfood systems. *J. Dairy Sci.* 78: 2524 – 2540.

Klupsch, H. J. 1984. Product improvement exemplified by kefir. *Dtsch. Molkerei Zeitung* 105: 446.

Koroleva, N.S. 1982. Special products (kefir, koumiss, etc.). *Proceedings XXI International Dairy Congress, Moscow* 2: 146 – 151.

Koroleva, N.S. 1988. Starters for fermented milks, section 4: kefir and kumys starters. Bulletin of the International Dairy Federation 227: 96 – 100.

Libudzisz, Z. and Piatkiewicz, A. 1990. Kefir production in Poland. Dairy Ind. Int., 55: 31 – 33.

Lin CW, Chen HL, Liu JR. 1999. Identification and characterization of lactic-acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. Aust J. Dairy Tech. 54: 14 – 18.

Marshall, R. T. 1992. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Am. Publ. Health Assoc., Inc. Washington D.C.

Marwaha, S.S., and J.F. Kennedy. 1988. Review: Whey pollution problem and potential utilization. Int. J. Food Sci. Technol. 23: 323 – 336.

Mawson, A. J. 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. Bioresource Technol. 47: 195 – 203.

Meilgaard, Morten, Gail V., Civille B and Carr T. 1991. Sensory Evaluation Techniques. 2nd Ed. pp 67 – 71.

Messens, W. and De Vuyst, L. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. Int. J. Food Micro. 72: 31 – 43.

Murtagh, J. E. 1995. Whey as a feedstock for alcohol production. Chapter 4 in The Alcohol Textbook eds T. P Lyons, D. R. Kelsall, and J. E. Murtagh, Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Nielsen SJ, Siega-Riz AM, Popkin BM. 2002. Trends in food locations and sources among adolescents and young adults. Prev. Med. 35: 107 – 113.

Nielsen SJ, Popkin BM. 2004. Changes in beverage intake between 1977 and 2001. Am. J. Prev. Med. 27: 205 – 210.

Pawliszyn, J. 1999. *Applications of Solid Phase Microextraction*. Ed. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. UK, p. 655.

Pilhofer, G. M., Lee, Hsing-Chi, Mccarthy, M. J., Tong, P. S. and German J. B. 1994. Functionality of milk fat in foam formation and stability. J. Dairy Sci. 77: 55 – 63.

Renner, E. and Renz-Shaven, 1986. Nahrwerttabellen für milch und milchprodukte. Verlag B. Renner.Köhner K. G. Gieben, Germany.

Schoevers A. and T.J. Britz. 2003. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. Int. J. Dairy Technol.56:183-186.

Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova Ts., Frengova G. and Spasov Z. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind. Micro. Biotech.* 28:1-6.

Siso, M. I. G. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour. Technol.* 57, 1 – 11.

Supelco. 2003 – 04. Chromatography – Products for analysis & Purification – Catálogo. Bellefonte, PA, USA, p. 363.

Tahara, T. and Kanatani, K. 1997. Isolation and partial amino acid sequence of bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61: 884 – 886.

Tin, C. S. F.; Mawson, A. J. 1993. Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. *Process Biochem.* 28, 217 – 221.

Toledo, R. T. 1994. *Fundamentals of Food Process Engineering: Second Edition.*

Trachoo, N. 2002. Yogurt: The fermented milk. *J. Sci. Technol.* 24: 727 – 737.

Trinidad, P. 2005. Personal Communication. Industria Lechera de Puerto Rico, Inc.

Ueda, K., Morgan, S., Fox, A. 1990. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry for Analytical Microbiology*. En: *Analytical Microbiology Methods: Chromatography and Mass Spectrometry*; Fox, A., Morgan, S., Larson, L., Odham, G., Eds.; Plenum Press: New York. U.S.A, pp. 19 – 52.

Viljoen, B.C., Mostert, J.F., Loretan T. 2003. Microbial flora associated with South African household kefir. *South African J. Sci.* 99:92-94.

Vujicic, I.F., Vulic, M. and Könyves, T. 1992. Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnology Letters* 14: 847 – 850.

Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A. and Van Boekel, M.A.J.S. 1999. *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes.* Marcell Dekker. Inc. New York

Zamfir, M., Callewart, R., Cornea, P.C., Savu, L., Vatafu, I. and De Vuyst, L. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *J. App. Micro.* 87: 923 – 931.

APÉNDICES

Datos y Estadística

Cuadro 1: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del pH al inicio de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la Varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
pH 0 Horas	15	0.80	0.65	0.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.08	6	0.01	5.40	0.0163
% Suero	0.07	4	0.02	7.11	0.0096
Muestreo	0.01	2	4.9E-03	2.00	0.1981
Error	0.02	8	2.5E-03		
Total	0.10	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
pH 0 Horas	15	0.68	0.66	3.5E-03

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	6.79	0.02	6.74	6.84	307.90	<0.0001	
% Suero	-1.9E-03	3.6E-04	-2.7E-03	-1.1E-03	-5.29	0.0001	27.10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.07	1	0.07	28.03	0.0001
% Suero	0.07	1	0.07	28.03	0.0001
Error	0.03	13	2.4E-03		
Lack of Fit	2.0E-03	3	6.7E-04	0.23	0.8759
Error Puro	0.03	10	3.0E-03		
Total	0.10	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.14015

Error: 0.0025 gl: 8

Proporción	Medias	n		
100% S	6.59	3	A	
25% L / 75% S	6.66	3	A	B
50% L / 50% S	6.70	3	A	B
75% L / 25% S	6.72	3	A	B
100 % Leche	6.80	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Cuadro 2: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del pH al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
pH 24 Horas	15	0.78	0.61	1.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.07	6	0.01	4.60	0.0257
% Suero	0.03	4	0.01	3.47	0.0632
Muestreo	0.03	2	0.02	6.87	0.0184
Error	0.02	8	2.5E-03		
Total	0.09	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
pH 24 Horas	15	0.22	0.16	0.01

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	4.37	0.03	4.30	4.44	134.02	<0.0001	
% Suero	1.0E-03	5.3E-04	-1.2E-04	2.2E-03	1.93	0.0761	4.52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.02	1	0.02	3.71	0.0761
% Suero	0.02	1	0.02	3.71	0.0761
Error	0.07	13	0.01		
Lack of Fit	0.01	3	5.0E-03	0.92	0.4680
Error Puro	0.05	10	0.01		
Total	0.09	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.14095

Error: 0.0025 gl: 8

Proporción	Medias	n	
100 % Leche	4.39	3	A
75% L / 25% S	4.39	3	A
25% L / 75% S	4.39	3	A
50% L / 50% S	4.43	3	A
100% S	4.51	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cuadro 3: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del cambio en pH para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Δ pH	15	0.84	0.71	3.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.24	6	0.04	6.81	0.0081
% Suero	0.18	4	0.05	7.77	0.0073
Muestreo	0.06	2	0.03	4.88	0.0411
Error	0.05	8	0.01		
Total	0.29	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
Δ pH	15	0.56	0.53	0.01

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	2.42	0.04	2.32	2.51	55.17	<0.0001	
% Suero	-2.9E-03	7.2E-04	-4.5E-03	-1.4E-03	-4.10	0.0013	16.67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.16	1	0.16	16.80	0.0013
% Suero	0.16	1	0.16	16.80	0.0013
Error	0.12	13	0.01		
Lack of Fit	0.02	3	0.01	0.67	0.5921
Error Puro	0.10	10	0.01		
Total	0.29	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.21588

Error: 0.0059 gl: 8

Proporción	Medias	n		
100% S	2.08	3	A	
50% L / 50% S	2.26	3	A	B
25% L / 75% S	2.27	3	A	B
75% L / 25% S	2.33	3		B
100 % Leche	2.41	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cuadro 4: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey de la acidez titulable al inicio de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Acidez Titulable 0 Horas	15	0.83	0.70	10.78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	6	1.1E-03	6.34	0.0101
% Suero	1.3E-03	4	3.2E-04	1.79	0.2236
Muestreo	0.01	2	2.7E-03	15.43	0.0018
Error	1.4E-03	8	1.8E-04		
Total	0.01	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
Acidez Titulable 0 Horas	15	0.03	0.00	8.6E-04

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	0.13	0.01	0.11	0.15	11.76	<0.0001	
% Suero	-1.2E-04	1.8E-04	-5.1E-04	2.7E-04	-0.67	0.5157	1.49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.7E-04	1	2.7E-04	0.45	0.5157
% Suero	2.7E-04	1	2.7E-04	0.45	0.5157
Error	0.01	13	6.0E-04		
Lack of Fit	1.0E-03	3	3.3E-04	0.48	0.7009
Error Puro	0.01	10	6.9E-04		
Total	0.01	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.03749

Error: 0.0002 gl: 8

Proporción	Medias	n	
100% S	0.11	3	A
100 % Leche	0.12	3	A
50% L / 50% S	0.12	3	A
75% L / 25% S	0.13	3	A
25% L / 75% S	0.13	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cuadro 5: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey de la acidez titulable al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Acidez Titulable 24 Horas	15	0.66	0.41	21.96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.12	6	0.02	2.60	0.1060
% Suero	0.10	4	0.02	3.22	0.0749
Muestreo	0.02	2	0.01	1.36	0.3107
Error	0.06	8	0.01		
Total	0.18	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
Acidez Titulable 24 Horas	15	0.14	0.07	0.02

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	0.46	0.05	0.35	0.56	9.34	<0.0001	
% Suero	-1.2E-03	8.0E-04	-2.9E-03	5.7E-04	-1.45	0.1702	3.03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.03	1	0.03	2.11	0.1702
% Suero	0.03	1	0.03	2.11	0.1702
Error	0.16	13	0.01		
Lack of Fit	0.07	3	0.02	2.98	0.0830
Error Puro	0.08	10	0.01		
Total	0.18	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.24697

Error: 0.0077 gl: 8

Proporción	Medias	n	
50% L / 50% S	0.29	3	A
100% S	0.32	3	A
100 % Leche	0.44	3	A
25% L / 75% S	0.45	3	A
75% L / 25% S	0.50	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cuadro 6: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del cambio en acidez titulable para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Δ Acidez Titulable	15	0.64	0.37	30.61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.10	6	0.02	2.35	0.1304
% Suero	0.08	4	0.02	2.98	0.0885
Muestreo	0.02	2	0.01	1.11	0.3754
Error	0.06	8	0.01		
Total	0.16	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
Δ Acidez Titulable	15	0.13	0.06	0.01

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	0.33	0.05	0.23	0.43	7.13	<0.0001	
% Suero	-1.0E-03	7.5E-04	-2.7E-03	5.8E-04	-1.39	0.1885	2.86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.02	1	0.02	1.93	0.1885
% Suero	0.02	1	0.02	1.93	0.1885
Error	0.14	13	0.01		
Lack of Fit	0.06	3	0.02	2.95	0.0847
Error Puro	0.07	10	0.01		
Total	0.16	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.23775

Error: 0.0071 gl: 8

Proporción	Medias	n	
50% L / 50% S	0.17	3	A
100% S	0.21	3	A
100 % Leche	0.31	3	A
25% L / 75% S	0.32	3	A
75% L / 25% S	0.37	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cuadro 7: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey de los sólidos totales al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Sólidos Totales	15	0.98	0.96	5.19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	65.56	6	10.93	60.25	<0.0001
% Suero	64.73	4	16.18	89.23	<0.0001
Muestreo	0.83	2	0.42	2.29	0.1634
Error	1.45	8	0.18		
Total	67.01	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
Sólidos Totales	15	0.97	0.96	0.25

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	11.15	0.19	10.74	11.56	58.74	<0.0001	
% Suero	-0.06	3.1E-03	-0.07	-0.05	-18.95	<0.0001	334.59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	64.67	1	64.67	359.18	<0.0001
% Suero	64.67	1	64.67	359.18	<0.0001
Error	2.34	13	0.18		
Lack of Fit	0.06	3	0.02	0.09	0.9662
Error Puro	2.28	10	0.23		
Total	67.01	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=1.20130

Error: 0.1813 gl: 8

Proporción	Medias	n				
100% S	5.35	3	A			
25% L / 75% S	6.68	3		B		
50% L / 50% S	8.17	3			C	
75% L / 25% S	9.62	3				D
100 % Leche	11.22	3				E

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cuadro 8: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del por ciento de grasa al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% Grasa	15	0.96	0.93	15.61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15.65	6	2.61	33.79	<0.0001
% Suero	15.63	4	3.91	50.64	<0.0001
Muestreo	0.02	2	0.01	0.10	0.9027
Error	0.62	8	0.08		
Total	16.26	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
% Grasa	15	0.96	0.95	0.07

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	3.22	0.10	2.99	3.45	30.77	<0.0001	
% Suero	-0.03	1.7E-03	-0.03	-0.03	-16.85	<0.0001	264.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15.55	1	15.55	283.96	<0.0001
% Suero	15.55	1	15.55	283.96	<0.0001
Error	0.71	13	0.05		
Lack of Fit	0.08	3	0.03	0.41	0.7467
Error Puro	0.63	10	0.06		
Total	16.26	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.78362

Error: 0.0772 gl: 8

Proporción	Medias	n	
100% S	0.27	3	A
25% L / 75% S	1.17	3	B
50% L / 50% S	1.73	3	B
75% L / 25% S	2.57	3	C
100 % Leche	3.17	3	C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cuadro 9: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey del por ciento de proteína al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Proteína	15	0.84	0.72	26.94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9.43	6	1.57	6.93	0.0077
% Suero	8.75	4	2.19	9.64	0.0038
Muestreo	0.69	2	0.34	1.52	0.2765
Error	1.82	8	0.23		
Total	11.25	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
Proteína	15	0.77	0.76	0.26

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	2.84	0.20	2.42	3.27	14.35	<0.0001	
% Suero	-0.02	3.2E-03	-0.03	-0.01	-6.65	<0.0001	42.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8.69	1	8.69	44.22	<0.0001
% Suero	8.69	1	8.69	44.22	<0.0001
Error	2.56	13	0.20		
Lack of Fit	0.05	3	0.02	0.07	0.9746
Error Puro	2.50	10	0.25		
Total	11.25	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=1.34376

Error: 0.2269 gl: 8

Proporción	Medias	n			
100% S	0.71	3	A		
25% L / 75% S	1.25	3	A	B	
50% L / 50% S	1.76	3	A	B	C
75% L / 25% S	2.20	3		B	C
100 % Leche	2.92	3			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cuadro 10: Análisis de varianza y regresión lineal del ácido láctico al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
Ácido Láctico	5	0.07	0.00	1.8E-03

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	0.86	0.02	0.80	0.93	45.32	<0.0001	
% Suero	-1.5E-04	3.1E-04	-1.1E-03	8.4E-04	-0.48	0.6668	1.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.4E-04	1	1.4E-04	0.23	0.6668
% Suero	1.4E-04	1	1.4E-04	0.23	0.6668
Error	1.8E-03	3	6.1E-04		
Total	2.0E-03	4			

Cuadro 11: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey de las bacterias al inicio de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Bacterias 0 Horas	15	0.88	0.78	3.63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.78	6	0.46	9.45	0.0029
% Suero	0.38	4	0.09	1.92	0.2008
Muestreo	2.40	2	1.20	24.50	0.0004
Error	0.39	8	0.05		
Total	3.17	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
Bacterias 0 Horas	15	0.06	0.00	0.30

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	6.25	0.21	5.79	6.72	29.22	<0.0001	
% Suero	-3.2E-03	3.5E-03	-0.01	4.4E-03	-0.92	0.3765	1.85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.19	1	0.19	0.84	0.3765
% Suero	0.19	1	0.19	0.84	0.3765
Error	2.98	13	0.23		
Lack of Fit	0.18	3	0.06	0.22	0.8806
Error Puro	2.79	10	0.28		
Total	3.17	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.62444

Error: 0.0490 gl: 8

Proporción	Medias	n	
25% L / 75% S	5.90	3	A
100% S	5.93	3	A
75% L / 25% S	6.10	3	A
100 % Leche	6.23	3	A
50% L / 50% S	6.30	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cuadro 12: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey de las bacterias al final de la fermentación para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Bacterias 24 Horas	15	0.95	0.91	2.05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4.05	6	0.67	23.53	0.0001
% Suero	1.21	4	0.30	10.56	0.0028
Muestreo	2.84	2	1.42	49.49	<0.0001
Error	0.23	8	0.03		
Total	4.28	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
Bacterias 24 Horas	15	0.16	0.10	0.36

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
Const	8.56	0.23	8.05	9.07	36.52	<0.0001	
% Suero	-0.01	3.8E-03	-0.01	2.1E-03	-1.60	0.1331	3.46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.71	1	0.71	2.57	0.1331
% Suero	0.71	1	0.71	2.57	0.1331
Error	3.57	13	0.27		
Lack of Fit	0.51	3	0.17	0.55	0.6599
Error Puro	3.07	10	0.31		
Total	4.28	14			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.47762

Error: 0.0287 gl: 8

Proporción	Medias	n				
25% L / 75% S	7.83	3	A			
100% S	8.10	3	A	B		
75% L / 25% S	8.23	3	A	B	C	
50% L / 50% S	8.43	3		B	C	
100 % Leche	8.67	3				C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cuadro 13: Análisis de varianza, regresión lineal y prueba Tukey para el cambio en bacterias para las distintas bebidas fermentadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Δ Bacterias	15	0.48	0.27	9.41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.38	4	0.10	2.31	0.1285
% Suero	0.38	4	0.10	2.31	0.1285
Error	0.41	10	0.04		
Total	0.80	14			

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
Δ Bacterias	15	0.20	0.14	0.06

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	2.31	0.10	2.09	2.52	23.34	<0.0001	
% Suero	-2.9E-03	1.6E-03	-0.01	5.5E-04	-1.82	0.0922	4.14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.16	1	0.16	3.30	0.0922
% Suero	0.16	1	0.16	3.30	0.0922
Error	0.63	13	0.05		
Lack of Fit	0.22	3	0.07	1.78	0.2135
Error Puro	0.41	10	0.04		
Total	0.80	14			

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.50594

Error: 0.0322 gl: 8

Proporción	Medias	n	
25% L / 75% S	1.93	3	A
50% L / 50% S	2.13	3	A
75% L / 25% S	2.13	3	A
100% S	2.17	3	A
100 % Leche	2.43	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)

Formulario 1: Guía del Experimentador para verificar cuantos panelistas acertaron correctamente

Hoja Del Experimentador

Leyenda:

1) A: 100% Leche

2) B: 75% Leche / 25% Suero

Panelista	Combinación	M1	M2	M3	M4	M5	Correcto
1	AAABB	862	245	458	396	522	
2	AABAB	223	398	183	765	138	
3	AABBA	756	954	266	174	496	
4	ABAAB	544	537	522	459	984	
5	ABABA	681	829	614	547	869	
6	ABBAA	199	113	941	933	375	X
7	BAAAB	918	481	797	621	743	
8	BAABA	335	662	875	282	617	X
9	BABAA	477	776	339	818	251	
10	BBAAA	653	489	538	216	446	
11	BBBAA	749	824	721	967	287	
12	BBABA	522	967	259	532	618	
13	BBAAB	475	172	986	859	925	
14	BABBA	894	333	612	728	869	X
15	BABAB	116	218	464	191	132	
16	BAABB	381	641	393	375	354	
17	ABBBA	968	755	847	643	773	
18	ABBAB	742	421	226	286	522	
19	ABABB	859	878	392	311	659	
20	AABBB	964	593	137	574	288	

Formulario 2: Hoja en que el panelista utilizó para contestar cuales eran las formulaciones diferentes

Panelista _____

Experimento: Diferencia General en las Bebidas Fermentadas

Instrucciones:

Se le están dando cinco (5) muestras de unas bebidas fermentadas. Hay tres (3) iguales y dos (2) diferentes. Evalúe las muestras de izquierda a derecha. Identifique las dos (2) muestras diferentes. Escriba los números de las muestras en los espacios provistos y marque al lado las muestras diferentes.

Muestras	Diferentes
_____	<input type="checkbox"/>

Figura 1: Las distintas bebidas fermentadas dentro de la incubadora a 25 °C por alrededor de 24 horas



Figura 2: Preparación del medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe “MRS”



Figura 3: Jarra (Gas Pack) con placas petri lista para ser incubada a 37 °C por 48 horas



Figura 4: Placa petri con colonias típicas de Lactóbacilos en medio de cultivo “MRS”

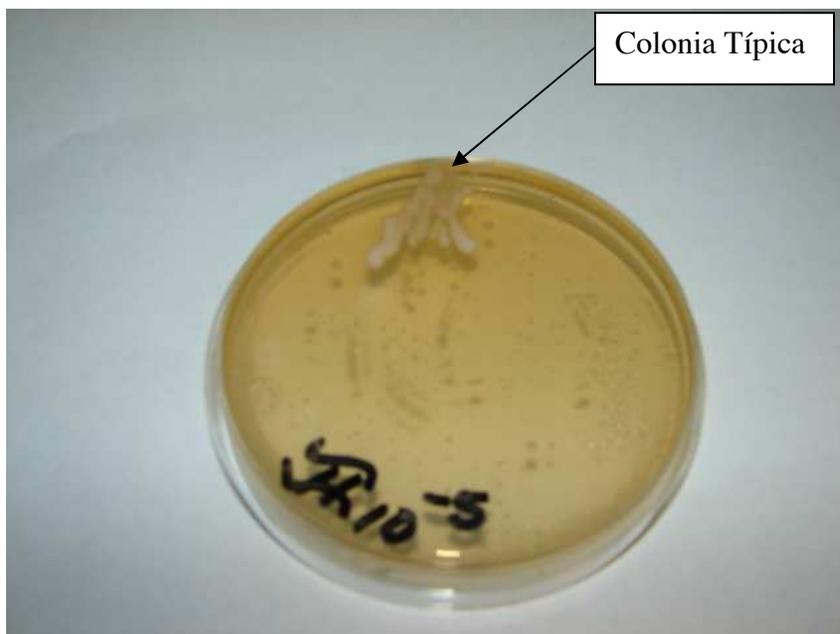


Figura 5: Digestor (RapadStill II, Model 65200, Labconco) utilizado para determinar la proteína bruta (Método Kjeldahl) en las distintas bebidas fermentadas



Figura 6: Digestión de la materia orgánica

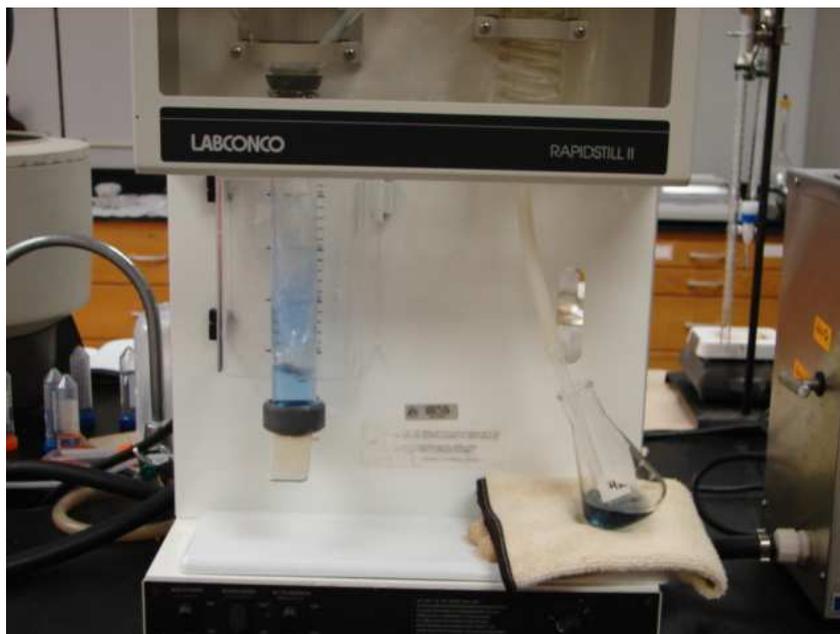


Figura 7: Apariencia Final de la muestra una vez finalizada la digestión de la materia orgánica



Figura 8: Apariencia Final de la muestra titulada con HCL 0.1N para determinar la cantidad de borato de amonio formado

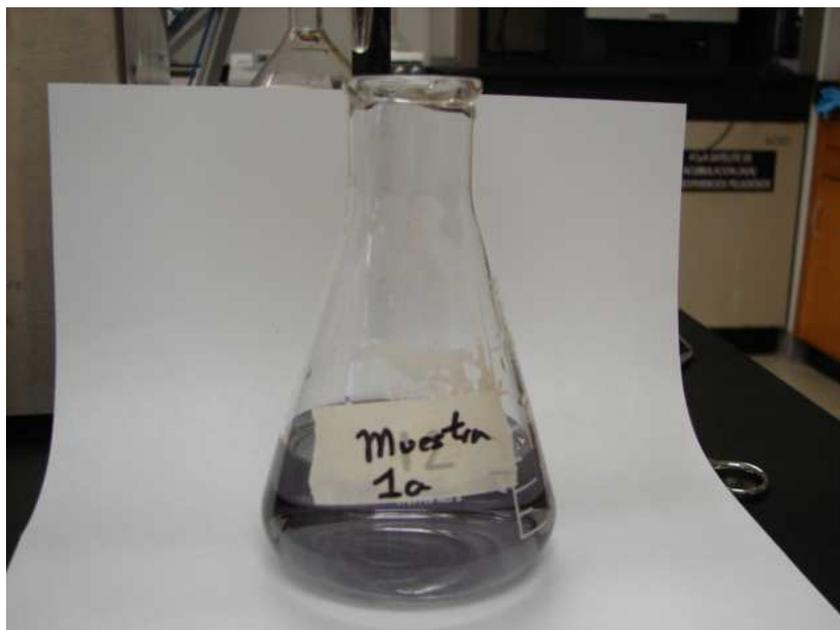


Figura 9: Viscosímetro (Brookfield LVDV III) utilizado para medir la viscosidad a las distintas bebidas fermentadas

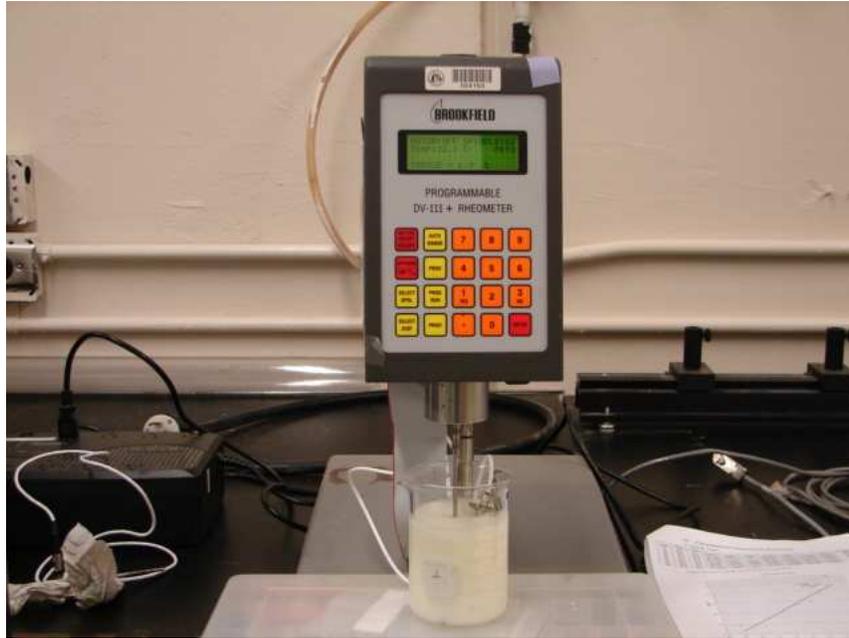


Figura 10: Adaptador (A-10 UL) utilizado en las proporciones de fermentados menos viscosos



Figura 11: Espectrofotómetro (Back Scientific 100 Vis Spectrophotometer, Model 6300, Serial Number: 6370) utilizado para medir el por ciento de ácido láctico en las distintas bebidas fermentadas



Figura 12: Cromatógrafo de Gas (HP5890 Series II Plus) y Detector Selectivo de Masa (HP 5971) utilizado para medir los compuestos volátiles y ácidos orgánicos de las distintas bebidas fermentadas

