



EL SABER DE MIS HIJOS  
HARÁ MI GRANDEZA

# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

---

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA  
Y METALURGIA**

**Efecto del Ultrasonido de Potencia Alta en la  
Biomasa, Composición Química y Viscosidad de  
Kéfir Elaborado a partir del Suero de Leche**

**Tesis**

**Que para obtener el título de:  
INGENIERO QUÍMICO**

**Presenta**

**CARLOS ALBERTO SÁNCHEZ FLORES**

**Hermosillo, Sonora**

**Febrero 2019**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## DEDICATORIA

A mis padres Octavio Sánchez Heredia y Rosa Flores Campos por su guía y apoyo constante e incondicional en el ámbito familiar y económico, así como la educación que me han brindado durante toda mi vida. Por sus buenos deseos e incontables consejos les estaré siempre agradecido.

A mis hermanos José Octavio Sánchez Flores y Luis Alfonso Sánchez Flores por su compañía e interés por mí durante todo este tiempo.

A mis amigos y compañeros de la carrera de Ingeniería Química que me han aconsejado y me han apoyado con sus buenos deseos.

A los académicos: Dr. José Carlos Rodríguez Figueroa, Dra. Esther Carrillo, Dr. Benjamín Wong, Q.B. María Elena Ochoa Landín por su valioso apoyo durante esta etapa.

A Claudia su amor y su incomparable apoyo todos los días me han brindado la pasión y el deseo de seguir persiguiendo mis sueños por lo que le estaré eternamente agradecido.

## AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Educación Pública y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó como parte del proyecto de ciencia básica (258483), la cual fue utilizada en la manutención.

A los integrantes de mi comité de tesis, Dra. Esther Carrillo Pérez, Dra. Lizette Del Toro Sánchez, Dr. Enrique Márquez Ríos y Dr. José Carlos Rodríguez Figueroa.

A mis profesores por haber compartido todos sus conocimientos y experiencias, así como todo el personal de la Universidad de Sonora.

A mis compañeros en el periodo de realización de tesis que estuvieron trabajando de forma independiente a la mía, pero siempre me brindaron su amistad y constante apoyo en el procedimiento de muestras y trabajo experimental.

A mi familia por todo el apoyo y el cariño recibido a lo largo de la carrera, muy indispensable pues me motivaba a seguir cada uno de los días.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
RESUMEN .....	x
INTRODUCCIÓN .....	xii
OBJETIVOS.....	xiii
Objetivo general.....	xiii
Objetivos particulares .....	xiii
ANTECEDENTES .....	1
Ultrasonido (US).....	1
Tipos de US .....	1
Aplicación de US en los alimentos.....	3
Efecto del US en productos lácteos .....	5
El lactosuero como sustrato.....	7
Kéfir.....	11
Propiedades reológicas del kéfir.....	16
Modelos matemáticos utilizados en la cinética de fermentación de los granos de kéfir .....	17
Hipótesis.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
Activación de los granos de kéfir.....	21
Obtención del lactosuero .....	21
Tratamientos .....	22
Concentración de la biomasa .....	24
Modelación matemática del incremento de la biomasa .....	24
Análisis de la composición química .....	24
<i>Materia seca</i> .....	25
<i>Cenizas</i> .....	25
<i>Proteína</i> .....	26
<i>Grasa</i> .....	26

<i>Acidez titulable</i> .....	27
<i>pH</i> .....	27
<i>°Bx</i> .....	27
<i>Exopolisacáridos</i> .....	28
<b>Análisis de viscosidad</b> .....	28
<b>Análisis estadístico</b> .....	30
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	31
<b>Incremento de la biomasa</b> .....	31
<b>Análisis del incremento de la biomasa mediante la aplicación de modelos matemáticos</b> .....	36
<b>Cinéticas de los componentes químicos</b> .....	42
<i>Acidez titulable y pH</i> .....	42
<i>°Bx</i> .....	42
<i>Exopolisacáridos</i> .....	46
<b>Composición química</b> .....	46
<b>Modificación de la viscosidad</b> .....	53
<b>CONCLUSIONES</b> .....	56
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	56
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo esquemático de la formación de granos de kéfir .....	15
<b>Figura 2.</b> Reómetro .....	29
<b>Figura 3.</b> Cinética del incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero a través del tiempo de fermentación .....	32
<b>Figura 4.</b> Modelos matemáticos del incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero .....	37
<b>Figura 5.</b> Modelos matemáticos del incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero previamente ultrasonicado	38
<b>Figura 6.</b> Incremento de la acidez titulable a través del tiempo de fermentación .....	43
<b>Figura 7.</b> Disminución de pH a través del tiempo de fermentación .....	44
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de sólidos solubles a través del tiempo de fermentación .....	45
<b>Figura 9.</b> Decremento de los exopolisacáridos a través del tiempo de fermentación .....	47
<b>Figura 10.</b> Efecto de los tratamientos sobre la concentración de la proteína a las 40 horas de incubación .....	52

**Figura 11.** Efecto de los tratamientos sobre la concentración de la grasa a las  
40 horas de incubación .....54



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición química del lactosuero .....	8
<b>Tabla 2.</b> Contenido de vitaminas en el lactosuero.....	9
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos identificados en la microbiota de los granos de kéfir.....	12
<b>Tabla 4.</b> Descripción de los tratamientos utilizados en los experimentos.....	23
<b>Tabla 5.</b> Incremento (%) de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero a través del tiempo de fermentación.....	33
<b>Tabla 6.</b> Incremento (%) de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero ultrasonificado a través del tiempo de fermentación .....	35
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la aplicación de los modelos matemáticos al incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en el lactosuero .....	40
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la aplicación de los modelos matemáticos al incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero previamente ultrasonificado.....	41
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la composición química de los tratamientos a las cero horas de incubación .....	48
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la composición química de los tratamientos a las 40 horas de incubación .....	50

<b>Tabla 11.</b> Resultados de la viscosidad del lactosuero a las 40 horas de incubación.....	.55
---	-----

## RESUMEN

El ultrasonido es una tecnología innovadora y eficaz con potencial para ser utilizada en el procesamiento de alimentos. En particular, el ultrasonido de potencia alta a través del fenómeno físico de la cavitación acústica ha demostrado beneficios prometedores en el área de los alimentos lácteos. El lactosuero es un subproducto derivado de la elaboración de queso que conserva el 50 % de la composición química de la leche. Alrededor del 85 % del total de la leche utilizada en la elaboración de queso termina transformada en lactosuero. Sin embargo, se ha reportado que únicamente el 50 % es utilizado en la generación de productos alimenticios. Por lo que es importante explorar alternativas viables e innovadoras que permitan la transformación de este subproducto de desecho en una materia prima con potencial para producir valor agregado. Por otro lado, en la actualidad se ha extendido a nivel mundial el consumo de kéfir, que es una bebida láctea fermentada refrescante con probados beneficios a la salud. Por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del ultrasonido de potencia alta en la biomasa, composición química y viscosidad del kéfir elaborado con lactosuero. Experimentalmente, el lactosuero fue inoculado con granos de kéfir ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), ultrasonificado ( $18 \text{ W cm}^{-2}$ ,  $3'$ ), ultrasonificado ( $18 \text{ W cm}^{-2}$ ,  $3'$ ) + inoculado ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) y el testigo. La fermentación del lactosuero se realizó a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  con agitación constante ( $100 \text{ rpm}$ ) por 40 horas y las muestras fueron tomadas cada 4 horas. Los resultados mostraron que el lactosuero sometido a ultrasonido de potencia alta e inoculado con los microorganismos que conforman los granos de kéfir mostraron significativamente ( $P < 0.01$ ) la mayor concentración de biomasa ( $38.31 \text{ g L}^{-1}$ ). Además, este tratamiento redujo el tiempo de fermentación en 8 horas comparado con la máxima concentración de biomasa ( $35.90 \text{ g L}^{-1}$ ) cuantificada en el lactosuero fermentado. Por otro lado, los valores de la cinética del incremento de la biomasa con respecto al tiempo de fermentación del lactosuero con la mayor cantidad de biomasa se ajustaron mejor al modelo de Gompertz ( $R^2_{\text{ajustada}}=0.9556$ ). Asimismo, el

lactosuero ultrasonicado presentó los valores más altos de acidez titulable ( $P < 0.01$ ) y los menores de pH. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.01$ ) entre los valores de °Brix, materia seca, grasa y proteína entre los tratamientos. En conclusión, la aplicación del ultrasonido de potencia alta al lactosuero incrementó la concentración de la biomasa de los granos de kéfir y redujo el tiempo de fermentación. Sin embargo, es necesario llevar a cabo investigación de frontera que permita explorar la generación de péptidos con actividad biológica derivados de la aplicación del ultrasonido de potencia alta.

## INTRODUCCIÓN

El ultrasonido es un conjunto de ondas sonoras que son emitidas a una frecuencia 18 kHz. Esta tecnología causa efectos en los alimentos debido a los fenómenos de cavitación, calefacción, agitación dinámica y turbulencia cuando es aplicada en la modalidad de potencia alta (Awad *et al.*, 2012). De hecho, estudios anteriores han demostrado que el uso del ultrasonido de potencia alta mejora el procesamiento térmico de los alimentos en términos de temperatura y tiempo (Pingret *et al.*, 2013).

El lactosuero o suero de leche es un subproducto de la elaboración de queso. Este proceso de manufactura genera alrededor del 83 % del volumen inicial de la leche, el cual conserva el 50 % de los componentes químicos. Esta composición convierte al lactosuero en un potente contaminante. De hecho, se ha reportado que solamente se aprovecha el 50 % como materia prima en otros procesos tecnológicos. Sin embargo, dada la calidad de los componentes químicos éste podría convertirse en una relevante materia prima con potencial para transformarse en un producto con valor agregado (Yadav *et al.*, 2015; Kosseva *et al.*, 2009; Panesar *et al.*, 2013).

El kéfir es una bebida fermentada tradicional que se ha producido y consumido durante miles de años desde Europa del Este hasta Mongolia. Esta bebida se elabora tradicionalmente inoculando los microorganismos presentes en los granos de kéfir, por lo que la cantidad de biomasa define el volumen a fermentar de leche (Apar *et al.*, 2017). La popularidad del kéfir ha aumentado gracias a los efectos benéficos sobre la salud que le han sido atribuidos, los cuales son asociados a los lácteos fermentados funcionales en la última década (Vinderola *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Topuz *et al.*, 2008).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Estudiar los efectos del ultrasonido de potencia alta en la biomasa, composición química y viscosidad del kéfir elaborado con lactosuero.

### **Objetivos particulares**

- 1.- Evaluar el incremento de la biomasa de los granos de kéfir durante la fermentación.
- 2.- Obtener los modelos matemáticos que mejor describan el crecimiento de la biomasa.
- 3.- Investigar el efecto del ultrasonido en la composición química del lactosuero.
- 4.- Estudiar los cambios que ocurren en la viscosidad del kéfir al finalizar la fermentación.

## ANTECEDENTES

### Ultrasonido (US)

El ultrasonido es una tecnología innovadora muy eficaz con potencial para ser utilizada en el procesamiento de alimentos. Esta tecnología se aplica en procesos tales como emulsificación, cristalización, homogeneización, hidrólisis, extracción e inactivación microbiana, entre otras. Aunque esta prometedora tecnología ha presentado muchas ventajas sobre los métodos convencionales, algunos productos alimenticios parecen presentar ciertas alteraciones después de la exposición a ultrasonidos y estos posibles efectos o consecuencias sobre la calidad del producto algunas veces son ignorados (Pingret *et al.*, 2013).

### Tipos de US

El US se clasifica en función de la frecuencia y potencia. El US de frecuencia alta (mayores a 100 kHz) y potencia baja (menor de  $1 \text{ W cm}^{-2}$ ) generalmente se emplea para garantizar la calidad, el control del proceso e inspeccionar alimentos (Mason, 1990; Floros y Liang, 1994; McClements 1995; Mason *et al.*, 1996; Jambrak *et al.*, 2014). Por otro lado, el US de frecuencia baja y potencia alta considera el rango de 16-100 kHz y la potencia va desde  $10\text{-}1000 \text{ W cm}^{-2}$ , el cual tiene una amplia variedad de aplicaciones. De hecho, este último es utilizado en alimentos generando efectos asociados a la cavitación, calefacción, agitación dinámica y turbulencia (Knorr *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2010).

La potencia del ultrasonido, que se considera como energía mecánica, se pierde parcialmente en forma de calor cuando el ultrasonido pasa a través del medio (Thompson y Doraiswamy, 1999; Jambrak *et al.*, 2014). Por lo que la radiación ultrasónica de un líquido produce calor generando cambios en la

temperatura en función del tiempo, lo que permite estimar la potencia acústica por la ecuación (1):

$$P = m \cdot C_p \cdot \left(\frac{dT}{dt}\right)_{t=0} \quad Ec. (1)$$

Donde  $m$  es la masa (g) del líquido sonicado,  $C_p$  es el coeficiente de calor específico a presión constante ( $J gK^{-1}$ ),  $dT dt^{-1}$  es el cambio de la temperatura con respecto al tiempo y  $P$  es la potencia acústica ( $W cm^{-2}$ ) (Jambrak *et al.*, 2014).

En general, los efectos del ultrasonido de potencia alta se atribuyen a la cavitación (Suslick *et al.*, 1999; Riener *et al.*, 2009). Este fenómeno provoca una oscilación de ondas sonoras, disolviendo los núcleos de los gases de oxígeno, hidrógeno y nitrógeno aumentando la presión del campo acústico, generando así micro burbujas (Ashokkumar *et al.*, 2008). Las cavitaciones pueden clasificarse en acústica, hidrodinámica, óptica y de partícula, basadas en su generación (Gogate *et al.*, 2006). Sólo las cavitaciones acústicas e hidrodinámicas sirven para generar las intensidades necesarias para inducir cambios químicos y físicos en diferentes sistemas alimenticios (carbohidratos, proteínas, lípidos, etc.). Las diferentes formas en que la cavitación se puede utilizar de manera beneficiosa en la aplicación del procesamiento de alimentos son la reducción del tiempo de reacción, el aumento en el rendimiento de la reacción, y usando menores condiciones de forzamiento (temperatura y presión) en comparación con las rutas convencionales. El periodo de reducción de las reacciones deseadas es reducido a una mayor selectividad de las vías de reacción (McClements, 1995).



La cavitación es indispensable porque ayuda a operaciones del procesamiento de alimentos tales como extracción, congelación, secado, emulsión, entre otras (Awad *et al.*, 2012).

### **Aplicación de US en los alimentos**

La aplicación del ultrasonido de potencia alta en la industria alimentaria ha sido objeto de investigación en los últimos años (Knorr *et al.*, 2004). Debido a la creciente demanda de los consumidores de alimentos de alta calidad, nuevos métodos seguros y efectivos de procesamiento y preservación de alimentos están siendo desarrollados. El secado es uno de los procedimientos más utilizados para preservar una gran variedad de alimentos y productos. Desafortunadamente, este proceso puede influir negativamente en la calidad del producto. Además, debido a la alta capacidad calorífica del agua, el proceso de secado suele ser un proceso de larga duración y de un uso intensivo de energía, es por eso que se está buscando nuevas técnicas de secado (Musielak *et al.*, 2016).

Los métodos térmicos de pasteurización y esterilización son las técnicas más usadas para la inactivación de microorganismos en productos alimenticios. La efectividad de estas técnicas depende de la temperatura y el tiempo de tratamiento; desafortunadamente, el incremento de la temperatura y tiempo de procesamiento prolongado pueden causar la pérdida de nutrientes, sabores indeseables y el deterioro de las propiedades funcionales de los productos alimenticios. La potencia del ultrasonido proporciona un método para mejorar el procesamiento térmico en términos de la temperatura y tiempo a través de la cavitación acústica. Las ventajas del ultrasonido sobre la pasteurización con calor minimizan la pérdida de sabor, mayor homogeneidad del tratamiento y un significativo ahorro de energía. Adicionalmente, el tratamiento se puede

intensificar con la aplicación de la manotermosonicación de la presión (Vercet *et al.*, 2001; Cameron *et al.*, 2010; Mason *et al.*, 2015).

La sonicación es capaz de reducir la temperatura y el tiempo del proceso de producción, manteniendo niveles similares de inactivación microbiana que los obtenidos por procesos convencionales (Riener *et al.*, 2009). Las ondas sonoras se consideran generalmente seguras, no tóxicas y amigables con el medio ambiente, esto hace del ultrasonido una ventaja importante sobre otras técnicas (Kentish y Ashokkumar, 2011; Arzeni *et al.*, 2012). Dicha tecnología puede usarse para ayudar en la cristalización controlando la nucleación y la tasa de crecimiento de cristales en alimentos congelados (Luque de Castro y Priego Capote, 2007; Pingret *et al.*, 2013). También reduce el ablandamiento de la textura y la liberación de líquido celular al descongelar (Zheng y Sun, 2006; Mason *et al.*, 2014), siendo esto de vital importancia para la aceptación del consumidor de carnes, frutas y hortalizas, así como para una mejor preservación de los nutrientes y compuestos bioactivos (Soria y Villamiel 2010). Sin embargo, una de las limitaciones del ultrasonido para la conservación de los alimentos es que la intensidad necesaria para lograr la inactivación microbiana es tal que también puede tener efectos físicos sobre los productos alimenticios (Jambrak *et al.*, 2008).

El ultrasonido de potencia alta ha sido aplicado para acelerar los procesos de secado, extracción y desgasificación de alimentos líquidos, así como la inducción de reacciones de oxidación-reducción, extracción de proteínas, inactivación microbiana y enzimática, inducción de nucleación, cristalización y emulsificación (Knorr *et al.*, 2004; Bhaskaracharya *et al.*, 2009; Camino *et al.*, 2009; Arzeni *et al.*, 2012).

## Efecto del US en productos lácteos

El uso del ultrasonido está siendo desarrollado en sistemas lácteos debido a que mejora la eficacia de los procesos de manufactura, capacidad de fabricar productos con funcionalidad, habilidad de preservar los alimentos, modular la actividad enzimática y la capacidad de mejorar la microestructura a través de interacciones de componentes. Los efectos físicos del ultrasonido inducido son utilizados en las aplicaciones tales como la mejora de la ultrafiltración de lactosuero, extracción de alimentos funcionales, reducción de viscosidad del producto, homogeneización de los glóbulos de grasa de la leche, cristalización de hielo y lactosa, fabricando yogures con propiedades reológicas superiores, el corte de bloques de queso y la reducción del tiempo de fermentación total del yogur, entre otros (Ashokkumar *et al.*, 2010; Chandrapala *et al.*, 2012).

La leche es a menudo pasteurizada antes de su uso en varios productos lácteos fermentados. La aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia en combinación con la presión externa (manosonicación), el calor (termosonicación) o ambas (manotermosonicación) ha sido importante para mejorar el perfil de seguridad de la leche y puede lograr la reducción de microorganismos patógenos incluyendo *Listeria innocua* y *Escherichia coli*. El procesamiento de leche utilizando ultrasonido de baja frecuencia también ha sido reportado que produce cambios fisicoquímicos beneficiosos en macromoléculas incluyendo modificación enzimática, homogeneización, pasteurización, reducción del tiempo de fermentación del yogur entre otros (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009; Ojha *et al.*, 2017).

Además de la muerte microbiana, la sonicación también puede usarse para inactivar las enzimas, lo cual es importante tanto para jugo de frutas como para productos lácteos (O'Donnell *et al.*, 2010).

La mayoría de los productos lácteos son elaborados tras procesar la leche de la vaca que está compuesta principalmente de agua con un contenido aproximado de 3.2 % de proteínas, 4.9 % de lactosa, 0.2 % de contenido no proteínico, 0.6 % de cenizas y 3.6 % de grasas, las principales familias de proteínas en la leche son las caseínas, las proteínas de los lactosueros y las inmunoglobulinas. Entre algunos de los productos lácteos se encuentra la leche, kéfir, nata, mantequilla, los quesos, yogur y el lactosuero (Charlebois y Haratifar 2015).

La combinación del US de potencia alta y baja frecuencia con el tratamiento de precalentamiento minimiza el espesamiento o gelificación de proteínas que contienen soluciones de lactosuero. Estas características del lactosuero después del pretratamiento asistido de US ayudan a mejorar la eficacia de la ultrafiltración utilizada para la separación y también ayuda evitando el bloqueo del orificio del dispositivo de atomización del secador por pulverización. Además, la estabilidad térmica de las proteínas del lactosuero. En la siguiente etapa del procesamiento, el uso de la atomización asistida por ultrasonido ayuda reduciendo los tiempos de tratamiento, así como producir mejor calidad del concentrado de proteína de lactosuero (WPC) en polvo. Después de la eliminación de las proteínas del lactosuero, la lactosa que permanece en la solución puede ser recuperada eficazmente mediante sonocristalización basada en el uso de un antisolvente como etanol (Gajendragadkar y Gogate, 2016).

Los desarrollos en varias tecnologías de separación sólido-líquido han sido utilizadas por la industria láctea para producir gran cantidad de productos de lactosuero con buenas funcionalidades, nutricionales y propiedades de sabor. La principal característica de estos productos es que las proteínas están presentes en gran parte de su forma nativa. Hay por lo menos dos razones que explican el gran número de productos de proteína de lactosuero desarrollados. En primer lugar, no se puede utilizar ningún espectro amplio de productos alimenticios, ya que cada uno requiere un producto de proteína de lactosuero de propiedades específicas. En segundo lugar, la producción de los productos

de proteína de lactosuero con más contenido de proteínas utiliza sólo una pequeña porción de lactosuero y habrá necesidad de utilizar o descartar la corriente residual de los efluentes, lo cual aumenta el costo total de producción. En general, los productos de proteína de lactosuero difieren en su composición principalmente en sus proteínas, lactosa, grasa y contenido mineral (Abd El-Salam *et al.*, 2009).

### **El lactosuero como sustrato**

El lactosuero fue descubierto hace unos 3,000 años. Aparte de ser valorado como agente medicinal en los siglos XVII y XVIII, el lactosuero ha sido considerado principalmente un desperdicio por la industria lechera (Smithers, 2008). Éste es un líquido translúcido verde obtenido de la leche después de la precipitación y eliminación de la caseína durante la elaboración del queso. Dicha precipitación está basada en la coagulación de las fracciones hidrofóbicas tras la actividad de la renina a pH 6.5 (Jelen, 2003; Adolfo *et al.*, 2009). La composición química del lactosuero se muestra en la Tabla 1.

Se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90 % del volumen de la leche. En el laboratorio de Ingeniería de alimentos se ha encontrado que el uso de 10 L de leche light se transforman en 831 g de queso y 8.3 L de lactosuero. El contenido de vitaminas presente en el lactosuero se muestra en la Tabla 2.

El lactosuero es producido en grandes cantidades por las industrias lecheras y se usa como sustrato para la producción de etanol, ácido láctico y levaduras alimenticias (Boyaval, 1998; Krischke *et al.*, 1991; Chiarini *et al.*, 1992; Rimada y Abraham, 2001).

**Tabla 1.** Composición química del lactosuero.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración (g L<sup>-1</sup>)</b>
Materia seca	63.0- 70.0
Lactosa	46.0- 52.0
Proteína	6.0- 10.0
Cenizas	5.7
Grasa	2.0- 3.0
Fosfatos	1.0- 3.0
Lactato	2.0
Cloruros	1.1
Calcio	0.4- 0.6

(*Panesar et al., 2007; Adolfo et al., 2009; Sanmartín et al., 2012*)

**Tabla 2.** Contenido de vitaminas en el lactosuero.

<b>Vitaminas</b>	<b>Concentración (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Necesidades diarias (mg)</b>
Tiamina	0.38	1.5
Riboflavina	1.2	1.5
Ácido nitotínico	0.85	10.0- 20.0
Ácido pantoténico	3.4	10.0
Piridoxina	0.42	1.5
Cobalamina	0.03	2.0
Ácido ascórbico	2.2	10.0- 75.0

(Adolfo *et al.*, 2009)

Éste ha sido utilizado para cultivar microorganismos productores de polisacáridos que consumen lactosa, disminuyendo la demanda biológica de oxígeno (Gassem *et al.*, 1997; Fialho *et al.*, 1999; Rimada y Abraham 2001). Es importante mencionar que el lactosuero presenta altas demandas química y biológica de oxígeno, 27-60 g L<sup>-1</sup> y 50-102 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, por lo que lo convierten en un potencial contaminante (Carvalho *et al.*, 2013). Estudios previos han demostrado que solamente alrededor del 50 % de la producción mundial de lactosuero es transformada en otros productos alimenticios (Yadav *et al.*, 2015; Kosseva *et al.*, 2009; Panesar *et al.*, 2013).

El lactosuero, un residuo líquido lácteo de costo insignificante, es una alternativa de materia prima para la producción de biomasa de kéfir. Este producto crea graves problemas de contaminación, ya que su tratamiento es muy difícil debido a su alta carga orgánica. Por otro lado, dada la valiosa composición química podría ayudar a la nutrición pues contiene cantidades considerables de lactosa (aproximadamente 5 %), proteínas, minerales, vitaminas, ácidos orgánicos y grasas. Por lo tanto, la conversión del lactosuero en productos de valor añadido es una preocupación importante para la ciencia y la industria (Bekatorou *et al.*, 2006; Dimetrellou *et al.*, 2007; Koutinas *et al.*, 2007; Dimetrellou *et al.*, 2008; Papastolou *et al.*, 2008; Apar *et al.*, 2017).

La industria láctea es uno de los sectores más importantes de la economía de países industrializados y en desarrollo. Aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero el cual retiene cerca de 50 % del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales. Algunas posibilidades de la utilización de este residuo han sido propuestas, pero las estadísticas indican que una importante porción de este residuo es descartado como efluente el cual crea un serio problema ambiental (Aider *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2009; Adolfo *et al.*, 2009). Esto se debe a que afecta física y químicamente la



estructura del suelo, causando así una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto (Aider *et al.*, 2009; Adolfo *et al.*, 2009). Por lo que es importante buscar alternativas viables que permitan el aprovechamiento de este subproducto.

## **Kéfir**

El kéfir es una bebida láctea fermentada refrescante auto-carbonatada cuyo origen se estima que fue las montañas del Cáucaso y que en la actualidad se ha extendido al mundo (Apar *et al.*, 2017). El kéfir tiene un sabor ácido, muestra efervescencia produciendo CO<sub>2</sub>, compuestos aromatizantes y pequeñas cantidades de etanol (Ertekin y Guzel-Seydim, 2010; Kök-Taş *et al.*, 2013). La elaboración de esta bebida requiere la inoculación de granos de kéfir en leche. Estos granos son considerados cultivos iniciadores, mismo que presentan forma irregular, 3 a 35 mm de diámetro, similares a los floretes de coliflor, gelatinosos blanco-amarillo y están incrustados en una matriz de polisacárido viscoso denominado kefirano. Este consorcio de microorganismos es el responsable de la producción de ácidos orgánicos y la fermentación alcohólica (Garrote *et al.*, 1997; Dimetrellou *et al.*, 2007; Papavasiliou *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2010; Apar *et al.*, 2017). La composición de la microbiota de los granos de kéfir se muestra en la Tabla 3. El desarrollo de la metagenómica ha permitido descubrir la presencia de más de 50 especies microbianas asociadas con granos de kéfir (Pogačić *et al.*, 2013).

El aumento de la biomasa de los granos de kéfir por inoculación tradicional de leche es relativamente bajo. Por otro lado, una limitación de la producción tradicional de kéfir a escala industrial es el lento aumento en la biomasa de los granos de kéfir.

**Tabla 3.** Microorganismos identificados en la microbiota de los granos de kéfir.

Microorganismos	Referencias
<b>Levaduras</b>	
<i>Saccharomyces (S.) cerevisiae</i>	Leite <i>et al.</i> , 2013
<i>S. martiniae</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2009
<i>S. unisporus</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida humilis</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida inconspicua</i>	Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida kefyr</i>	Wyder <i>et al.</i> , 1997
<i>Candida colliculosa</i>	Wyder <i>et al.</i> , 1997
<i>Kluyveromyces (Klu.) marxianus</i>	Kök-Taş <i>et al.</i> , 2012
<i>Klu. siamensis</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2009
<i>Klu. lactis</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2009
<i>Klu. dobzhanskii</i>	Kök-Taş <i>et al.</i> , 2012
<i>Kazachatania (Kaz.) unispora</i>	Texeira <i>et al.</i> , 2010
<i>Kaz. exigua</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2009
<i>Torulospora delbrueckii</i>	Wyder <i>et al.</i> , 1997
<i>Brettanomyces anomalus</i>	Wyder <i>et al.</i> , 1997
<b>Bifidobacterias</b>	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Marsh <i>et al.</i> , 2013
<i>Bifidobacterium spp</i>	Kök-Taş <i>et al.</i> , 2012
<i>Bifidobacterium breve</i>	Dobson <i>et al.</i> , 2011
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Dobson <i>et al.</i> , 2011
<i>Bifidobacterium longum</i>	Dobson <i>et al.</i> , 2011
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Dobson <i>et al.</i> , 2011

---

**Bacterias ácido acéticas**

<i>Acetobacter lovaniensis</i>	Korsak <i>et al.</i> , 2015
<i>Acetobacter syzygii</i>	Cruz Pedrozo M. <i>et al.</i> , 2010
<i>Acetobacter orientalis</i>	Korsak <i>et al.</i> , 2015
<i>Gluconobacter japonicus</i>	Cruz Pedrozo M. <i>et al.</i> , 2010
<i>Gluconobacter frateurii</i>	Korsak <i>et al.</i> , 2015

**Bacterias ácido lácticas**

<i>Lactococcus (Lc.) lactis</i>	Kesmen y Kacmaz, 2011
<i>Streptococcus thermophiles</i>	Kök-Taş <i>et al.</i> , 2012
<i>Lactobacillus (Lb.) kefiranofaciens</i>	Leite <i>et al.</i> , 2013
<i>Lb. kefiranofaciens subsp. kefirgranum</i>	Kök-Taş <i>et al.</i> , 2012
<i>Lb. paracasei subsp. paracasei</i>	Santos <i>et al.</i> , 2003
<i>Lb. helveticus</i>	Kök-Taş <i>et al.</i> , 2012
<i>Lb. casei</i>	Kesmen y Kacmaz, 2011
<i>Lb. acidophilus</i>	Kök-Taş <i>et al.</i> , 2012
<i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Leuconostoc (Leu.) mesenteroides</i>	Leite <i>et al.</i> , 2013
<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	Kesmen y Kacmaz, 2011

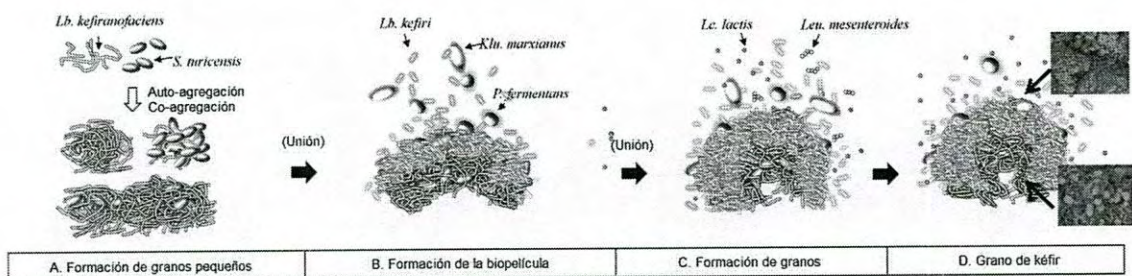
---

(Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2017)

La composición microbiana de los granos de kéfir proporciona nuevas aplicaciones, como las producciones de pan, levadura, queso, polisacáridos, compuestos de aroma volátil y etanol (Dimitrellou *et al.*, 2007; Apar *et al.*, 2017). Por lo tanto, la generación de biomasa de los granos de kéfir debe mejorarse utilizando medios alternativos de cultivo y optimizando las condiciones del proceso (Chen *et al.*, 2006).

La popularidad del kéfir ha aumentado gracias a los efectos benéficos sobre la salud que le han sido atribuidos, los cuales han sido asociados a los lácteos fermentados funcionales en la última década (Vinderola *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Topuz *et al.*, 2008; Seydim, 2001; Golowczyc *et al.*, 2008; Piermaria *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Guzel-Seydim *et al.*, 2010; Kök-Taş *et al.*, 2013). La principal diferencia entre el kéfir y las bebidas fermentadas tradicionales radica en la actividad metabólica de los microorganismos que conforman la microbiota de los granos de kéfir (Malbaşa *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2013). El esquema de la formación de los granos de kéfir se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, el kefirano que es el principal polisacárido de los granos de kéfir, tiene un potencial importante como goma de mascar en la industria, en las producciones de material de embalaje, o un agente de fortificación en los alimentos debido a sus conocidos beneficios para la salud (Rimada y Abraham 2006; Kwon *et al.*, 2006; Piermaria *et al.*, 2009; Kök-Taş *et al.*, 2013). El incremento de grano de kéfir también afecta positivamente a la producción de kefirano (Guzel-Seydim *et al.*, 2011).

El kéfir tiene un valor nutricional muy alto, ya que contiene todos los nutrientes de la leche. Incorpora varios minerales esenciales, vitaminas, aminoácidos y enzimas, en particular calcio, potasio, fósforo, magnesio y vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, K y C (Irigoyen *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2013; Apar *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Modelo esquemático de la formación de granos de kéfir.  
 (Z. B. Guzel- Seydim *et al.*, 2011; Wang, 2012; Pogačić *et al.*, 2013)

Estudios epidemiológicos han demostrado que la ingesta de productos lácteos fermentados puede disminuir el riesgo de aparición de cáncer en mujeres (Reddy *et al.*, 1983; Veer *et al.*, 1989; Ahmed *et al.*, 2013). Esta reducción del riesgo de cáncer de mama puede atribuirse a la presencia de componentes bioactivos en la leche fermentada que incluyen proteínas y pequeños péptidos. La actividad antitumorígena del kéfir ha sido confirmada mediante ensayos de modelos tanto en cáncer como en células tumorales cultivadas (Svensson *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2013). Estos componentes bioactivos tienen la capacidad de prevenir la iniciación del cáncer; estos también funcionan suprimiendo el inicio del crecimiento del tumor obstaculizando ciertas enzimas para la conversión de pro-carcinógeno a carcinógeno (Ahmed *et al.*, 2013; Arslan 2015). Además, se ha descrito que el kefirano posee actividad antitumoral (Shiomi *et al.*, 1982; Lin, Je-Ruei Liu 2000). Los microorganismos que constituyen los granos de kéfir producen ácidos orgánicos, antibióticos, bacteriocinas, que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos en la leche (Angulo *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 2013).

Los productos lácteos fermentados han jugado durante mucho tiempo un papel importante en la dieta de personas de todo el mundo. Ellos producen una amplia gama de efectos fisiológicos y terapéuticos, incluyendo la estimulación del sistema inmune (Gill, 1998; Vinderola *et al.*, 2005).

### **Propiedades reológicas del kéfir**

Diversos estudios han evaluado las propiedades reológicas del kéfir. Esto se debe a que la viscosidad juega un papel importante en la aceptación de los alimentos (Irigoyen *et al.*, 2005; Kök-Taş *et al.*, 2013). De acuerdo con ellos, la presencia del exopolisacárido kefirano repercute directamente en la viscosidad del producto terminado.

Asimismo, ellos demostraron que la concentración de exopolisacárido en el kéfir disminuye proporcionalmente conforme aumenta el tiempo de fermentación.

### **Modelos matemáticos utilizados en la cinética de fermentación de los granos de kéfir**

Debido a la incesante búsqueda de la optimización, monitoreo y control del incremento de la biomasa del kéfir, se han propuesto diversos modelos para el estudio de la cinética de crecimiento de los granos de kéfir. Los más utilizados son los basados en los modelos de Gompertz, Logístico y Richards (Zajšek y Goršek, 2010).

#### **Modelo de Gompertz**

El modelo de Gompertz es ampliamente utilizado para esquematizar el crecimiento microbiano por su precisión en el ajuste de datos experimentales (Zwietering *et al.*, 1990).

Este modelo ha sido exitosamente utilizado para representar respuestas no lineales. Su forma modificada ha sido utilizada para analizar más detalladamente las curvas de crecimiento microbiano, por las diversas variables que propone. Una ventaja de usar este modelo es que la función de Gompertz no asume constantes de índice de mortalidad en la curva de crecimiento (Linton *et al.*, 1994).

La ecuación de Gompertz está dada por la ecuación (2):

$$y = ae^{-e^{-k(x-xc)}} \quad \text{Ec. (2)}$$

**Donde:**

$x = \text{tiempo (horas)}$

$a, k \text{ y } xc = \text{constantes}$

(Zwietering *et al.*, 1990)

### **Modelo Logístico**

El modelo Logístico al igual que el de Gompertz, ha sido ampliamente utilizado, no solo para representar el crecimiento de la biomasa sino también para modelar el decaimiento o incremento del pH (Kaptan *et al.*, 2015).

Este modelo describe los cambios en el número de organismos en función de la Tasa de crecimiento, biomasa inicial, Concentración máxima de biomasa y el Tiempo, donde se asume que existe suficiente sustrato (Phukoetphim *et al.*, 2017).

La ecuación Logística está dada por la ecuación (3):

$$y = \frac{a}{1+e^{-k(x-xc)}} \quad \text{Ec. (3)}$$

**Donde:**

$x = \text{tiempo (horas)}$

$a, k \text{ y } xc = \text{constantes}$

(Zwietering *et al.*, 1990)



## Modelo de Richards

El modelo Richards es el más flexible entre los modelos de tres parámetros, ya que posee un parámetro que permite modelar curvas con mayor precisión y un valor menor de error estándar. Sin embargo, ha sido criticado por presentar fallas en el ajuste de datos experimentales (Demirhan *et al.*, 2011).

La ecuación de Richards está dada por la ecuación (4):

$$y = a[1 + (d - 1)e^{-k(x-xc)}]^{1/(1-d)} \quad \text{Ec. (4)}$$

**Donde:**

$x$  = tiempo (horas)

$a, d, k$  y  $xc$  = constantes

(Zwietering *et al.*, 1990)

## **Hipótesis**

La aplicación de ultrasonido de potencia alta sobre el lactosuero inoculado con granos de kéfir incrementa la concentración de biomasa y modifica la composición química y viscosidad a través del tiempo de fermentación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Activación de los granos de kéfir

En este experimento se utilizaron granos de kéfir provenientes del Laboratorio de Ingeniería de Alimentos del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora. La activación de los granos de kéfir se realizó inoculándolos en leche comercial light (1 % grasa) ultrapasteurizada e incubados a  $25 \pm 1$  °C por 24 horas. Posteriormente, los granos fueron colectados a través de la filtración de kéfir, enjuagados con agua potable e inoculados de nuevo. Este procedimiento se realizó al menos seis veces para activarlos (Demirhan *et al.*, 2013).

### Obtención del lactosuero

El lactosuero fue obtenido a partir de leche pasteurizada comercial. La composición química (% p/p) de la leche incluyó 3.06 % proteína, 0.98 % grasa, 0.63 % carbohidratos. La leche (9 L) se calentó a 32-36 °C, se le adicionó  $\text{CaCl}_2$  ( $0.83 \text{ g L}^{-1}$ ) y quimosina comercial ( $0.55 \text{ mL L}^{-1}$ ). Posteriormente, la mezcla reposó durante 1.5 horas aproximadamente hasta confirmar la presencia de la cuajada. Luego, ésta se cortó y calentó hasta alcanzar 40 °C, lo que permitió separarla del lactosuero. Este último fue pasado por una malla de cielo doblada cuatro veces para eliminar restos de caseína. Este proceso fue repetido para obtener la máxima cantidad de lactosuero (Tarango-Hernández *et al.*, 2015).

## Tratamientos

El lactosuero fue fermentado con granos de kéfir y/o ultrasonicado. Los tratamientos utilizados en este experimento se muestran en la Tabla 4. Las muestras fueron sometidas al ultrasonido de potencia alta a 6 °C con un sonotrodo de 22 mm de diámetro y 100 mm de longitud modelo S24d22D (Hielscher Ultrasonic, Alemania) a una profundidad de 3 cm. La capacidad del procesador ultrasónico fue de 400 W y 24 kHz (UP400St, Hielscher Ultrasonic, Alemania). La intensidad del ultrasonido fue calculada utilizando la siguiente fórmula\*:

$$\text{Intensidad del Ultrasonido} = \frac{4P}{\pi D^2} \quad \text{Ec. (5)}$$

### Donde:

$P$  = potencia (W)

$D$  = diámetro del sonotrodo (cm)

\*(O'Donnell *et al.*, 2010)

La intensidad del ultrasonido aplicada a las muestras fue de 17.88 W cm<sup>-2</sup>. Por otro lado, los tratamientos fermentados incluyeron la concentración inicial de inóculo de 30 g de granos de kéfir por litro de lactosuero. La fermentación se llevó a cabo en una incubadora con agitación (CVP-500, CScientific, E.U.A.) a 25 ± 1 °C por 40 horas con agitación constante rotatoria a 100 rpm en condiciones atmosféricas. Se tomaron muestras cada cuatro horas de los experimentos de cada tratamiento.

**Tabla 4.** Descripción de los tratamientos utilizados en los experimentos.

Tratamiento	Fermentación con granos de kéfir (30 g L <sup>-1</sup> )	Ultrasonido (68 W, 3 min)
1	-	-
2	√	-
3	-	√
4	√	√

### **Concentración de la biomasa**

Las muestras de lactosuero fermentado fueron filtradas con un colador para separar los granos de kéfir. Luego, estos fueron lavados con agua potable, escurridos y centrifugados a una velocidad de 2,700 x g por 15 minutos a 20 °C. El sobrenadante se desechó mientras que la biomasa fue escurrida de nuevo y pesada en una balanza (AND HR-200, Japón). La concentración de la biomasa fue reportada en g L<sup>-1</sup> (Tramšek y Goršek, 2008).

### **Modelación matemática del incremento de la biomasa**

Los datos experimentales del incremento de la biomasa de los granos de kéfir fueron modelados matemáticamente. Los modelos de Gompertz, Richards y Logístico fueron utilizados para describir el incremento de la biomasa a través del tiempo de fermentación. La modelación se llevó a cabo con el software Origin® 2017 (MA, E.U.A.) utilizando la función logística sigmoideal y el algoritmo Levenberg-Marquadt. El indicador estadístico de la regresión no lineal R<sup>2</sup> ajustada fue obtenido directamente del software.

### **Análisis de la composición química**

Las muestras de lactosuero de cada uno de los tratamientos fueron caracterizadas fisicoquímicamente. La composición química incluye materia seca (método 925.23; AOAC International 2012), cenizas (método 945.46; AOAC International, 2012), proteína (método 939.02; AOAC International, 2000) y grasa (método 989.05; AOAC International, 2012). Estos últimos fueron medidos a las 0 y 40 h de incubación. Por otro lado, los análisis acidez titulable (método 947.05; AOAC Internacional, 2012), pH (Tarango-Hernández *et al.*, 2015), °bx (Floren *et al.*, 2016) y exopolisacáridos (Van Geel-Schutten *et al.*,

1998; Purwandari *et al.*, 2007) se midieron cada cuatro horas durante el tiempo de fermentación.

### *Materia seca*

La materia seca se analizó utilizando el método 925.23 (AOAC International 2012). Éste considera eliminar la humedad de las muestras hasta llevarlas a peso constante. El porcentaje de materia seca se evaluó utilizando la siguiente ecuación (6):

$$H(\%) = \frac{(P. Charola + P. muestra) - (P. Charola + P. muestra seca)}{P. muestra} * 100 \text{ Ec. (6)}$$

**Donde:**

*H = humedad*

*P = peso*

Y posteriormente se obtuvo la materia seca con la ecuación (7):

$$\text{Materia Seca (\%)} = 100 \% - H \% \quad \text{Ec. (7)}$$

### *Cenizas*

La cuantificación de ceniza se llevó a cabo mediante el método 945.46 (AOAC International, 2012). La concentración de cenizas fue evaluada y reportada como porcentaje utilizando la siguiente ecuación (8):

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{[(\text{Peso de crisol} + \text{muestra seca}) - \text{Peso de crisol}]}{\text{Peso de muestra húmeda}} * 100 \text{ Ec. (8)}$$

### *Proteína*

La concentración de la proteína en las muestras se cuantificó utilizando la metodología MicroKjeldahl (método 939.02; AOAC International 2000). El factor que se utilizó fue específico para alimentos lácteos. El porcentaje de proteína fue obtenido mediante la ecuación (9):

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{(\text{mL HCl gastados})(N \text{ HCl})(0.01401)(\text{Factor})}{g \text{ de muestra}} * 100 \quad \text{Ec. (9)}$$

**Donde:**

*N = Normalidad*

*F = 6.38*

### *Grasa*

La cuantificación de grasa se realizó usando la metodología de Mojonnier (método 989.05; AOAC International, 2012). Agua destilada fue usada como blanco. El porcentaje de grasa de las muestras se obtuvo con la siguiente ecuación (10):

$$\text{Grasa \%} = \frac{(\text{PR con grasa} - \text{PR}) - \text{Peso del blanco}}{g \text{ de muestra}} * 100 \quad \text{Ec. (10)}$$

**Donde:**

*PR = peso del recipiente*



### *Acidez titulable*

La acidez titulable se midió utilizando el método 947.05 (AOAC Internacional, 2012). Estas mediciones se llevaron a cabo mediante titulación ácido-base. El porcentaje de acidez titulable se obtuvo mediante la ecuación (11):

$$\text{Acidez titulable (\%)} = \frac{\text{Volumen NaOH gastado} * N.NaOH}{g \text{ muestra}} * 100 \quad \text{Ec. (11)}$$

#### **Donde:**

*N = Normalidad*

#### *pH*

Los tratamientos fueron sometidos a la medición de pH siguiendo la metodología propuesta por Tarango-Hernández et al. (2015). Las mediciones se llevaron a cabo con un potenciómetro Star 4 Orion (Thermo Scientific, Singapur).

#### *°Bx*

Los sólidos solubles se midieron siguiendo la metodología propuesta por Floren et al., (2016). Este análisis se realizó utilizando un refractómetro SPER Scientific 300034 (E.U.A.) y se reportaron como porcentaje.

## *Exopolisacáridos*

Los exopolisacáridos se cuantificaron siguiendo la metodología propuesta por Van Geel-Schutten *et al.* (1998) con modificaciones. Los resultados fueron reportados en  $g L^{-1}$ .

La concentración de exopolisacáridos se obtuvo aplicando la siguiente ecuación (12):

$$EPS (g L^{-1}) = \frac{\text{Peso crisol con EPS (g)} - \text{Peso crisol (g)}}{\text{muestra (L)}} \quad \text{Ec. (12)}$$

## **Análisis de viscosidad**

El análisis de la viscosidad se realizó siguiendo la metodología propuesta por Kök-Taş *et al.*, (2013) con algunas modificaciones. La viscosidad se midió en muestras (18 mL) refrigeradas a 4 °C previamente incubadas por 40 horas. Las mediciones se realizaron en un reómetro Strasse 20 (MCR102 Anton Paar, Graz, Austria). La viscosidad fue evaluada utilizando una celda de cilindros concéntricos CC27-SN31649 (Figura 2) aplicando un rango de velocidades de corte de  $1 s^{-1}$  hasta  $15 s^{-1}$ . Las lecturas de viscosidad fueron reportadas en mPa's y tomadas cada 2 segundos durante 100 segundos. Los datos obtenidos fueron procesados con el software Star REOPLUS/23 V3.62 (Austria).



**Figura 2. Reómetro**

## **Análisis estadístico**

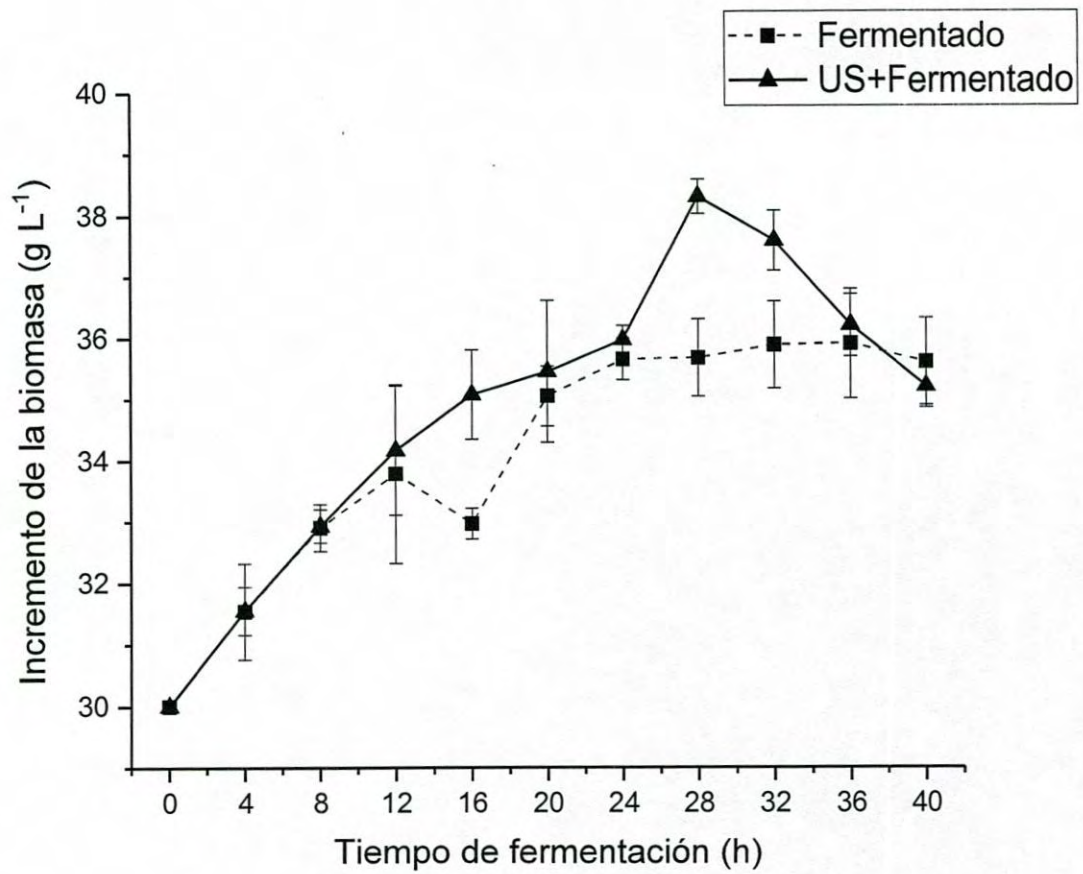
Los experimentos se repitieron 3 veces y los análisis se realizaron al menos por triplicado. Una vez comprobada la normalidad de los datos resultantes, éstos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA, GLM). Las diferencias entre los tratamientos fueron evaluadas a través del análisis de comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tuckey y Kramer ( $\alpha = 0.01$ ). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software NCSS 2012 (NCSS Inc., Kaysville, UT).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Incremento de la biomasa

La cinética del incremento de la biomasa de los granos de kéfir a través del tiempo de fermentación se muestra en la Figura 3. Los granos de kéfir inoculados inicialmente en lactosuero ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) presentaron el crecimiento máximo de biomasa de  $35.90 \text{ g L}^{-1}$  a las 36 h de incubación, mientras que los que fueron inoculados y sometidos a ultrasonido de potencia alta a las 28 h de incubación alcanzaron los  $38.31 \text{ g L}^{-1}$ . Por lo que éstos resultados muestran una reducción de 8 horas en el tiempo de fermentación. Estudios previos han reportado que el ultrasonido de potencia alta incrementa el consumo de lactosa significativamente, acelerando el metabolismo de los microorganismos (Nguyen *et al.*, 2012). Asimismo, Ewe *et al.* (2012) reportaron que este tipo de ultrasonido incrementó la actividad de las enzimas  $\beta$ -glucosidasas intra y extracelulares. Además, ellos encontraron que esta tecnología emergente fungió como un factor promotor del crecimiento de bacterias ácido lácticas, ya que se observaron concentraciones significativamente superiores al control. Por lo que la aplicación del ultrasonido de potencia alta sobre el lactosuero podría jugar un papel relevante en el incremento de la biomasa de los granos de kéfir en un menor tiempo de fermentación.

El incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero se muestra en las Tablas 5 y 6. Éstas muestran las medias experimentales del crecimiento de la biomasa de granos de kéfir ( $m_{KG}$ ), incremento ( $m_{KG,i}$ ) y porcentaje del incremento ( $W_{KG,i}$ ) en los diferentes tiempos de fermentación ( $t_f$ ). Los granos de kéfir inoculados en el lactosuero alcanzaron un crecimiento máximo de  $5.9 \text{ g L}^{-1}$ , lo que representó un incremento de 19.67 % a las 36 horas de fermentación (Tabla 5). Por otro lado, los granos inoculados en el



**Figura 3.** Cinética del incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero a través del tiempo de fermentación. Los datos muestran los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 5.** Incremento (%) de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero a través del tiempo de fermentación.

$t_f$ (h)	$m_{KG}$ (g L <sup>-1</sup> )	$m_{KG,i}$ (g L <sup>-1</sup> )	$w_{KG,i}$ (%)
0	30.00 ± 0.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4	31.54 ± 0.8	1.54 ± 0.78	5.13 ± 2.61
8	32.90 ± 0.4	2.90 ± 0.38	9.67 ± 1.27
12	33.78 ± 1.5	3.78 ± 1.46	12.60 ± 4.85
16	32.96 ± 0.3	2.96 ± 0.25	9.87 ± 0.83
20	35.05 ± 0.5	5.05 ± 0.49	16.83 ± 1.64
24	35.65 ± 0.3	5.65 ± 0.34	18.33 ± 1.14
28	35.67 ± 0.6	5.67 ± 0.63	18.90 ± 2.11
32	35.88 ± 0.7	5.88 ± 0.71	19.60 ± 2.35
36	35.90 ± 0.9	5.90 ± 0.90	19.67 ± 3.01
40	35.56 ± 0.7	5.56 ± 0.71	18.53 ± 2.37

Los datos muestran los valores de las medias ± desviación estándar.

$t_f$  = tiempo de fermentación.

$m_{KG}$  = crecimiento de la biomasa de granos de kéfir.

$m_{KG,i}$  = incremento de la biomasa de granos de kéfir.

$w_{KG,i}$  = porcentaje del incremento de granos de kéfir.

lactosuero ultrasonificado crecieron  $8.31 \text{ g L}^{-1}$ , presentando un incremento máximo de 27.70 % a las 28 h (Tabla 6).

En un estudio previo se evaluó el incremento de la biomasa de los granos de kéfir utilizando lactosuero desproteínizado como sustrato. Éste fue inoculado con una concentración de  $100 \text{ g L}^{-1}$  e incubado a  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . La mayor cantidad de biomasa fue alcanzada a las 50 h de fermentación (Rimada y Abraham, 2001). Por otro lado, leche entera inoculada inicialmente con  $75 \text{ g L}^{-1}$  presentó el máximo incremento (25.8 %) de la biomasa a las 24 h de fermentación, lo que mostró un aumento de  $1.08 \text{ } \%$   $\text{h}^{-1}$  aproximadamente (Tramšek y Goršek, 2008). Asimismo, Demirhan *et al.* (2011), inocularon inicialmente  $35 \text{ g L}^{-1}$  en leche de vaca light (0.1 % grasa) ultrapasteurizada. El máximo incremento (42.85 %) de la biomasa fue reportado a las 24 h de fermentación, lo que representó un aumento de  $1.79 \text{ } \%$   $\text{h}^{-1}$  aproximadamente. Este trabajo de tesis mostró que el lactosuero ultrasonificado incrementó la biomasa en  $0.99 \text{ } \%$   $\text{h}^{-1}$ . Tanto el inóculo inicial como la composición química de los sustratos juegan un papel relevante en el incremento de la biomasa de los granos de kéfir.

En este sentido, es importante mencionar que existe una gran diferencia entre la composición química de la leche y el lactosuero. Este último conserva solo el 50 % aproximadamente de los constituyentes iniciales en donde se incluyen 100 % de lactosa, 71 % de minerales y 20 % de proteína de la leche (Smithers, 2008).

Apar *et al.* (2017) reportaron que después de 24 h de fermentación, la biomasa seca de los granos de kéfir presentó un incremento de 2 % (p/v) más en lactosuero enriquecido con 20 % de leche (3.5 % proteína, 5 % carbohidratos, 0.1 % grasa y 0.13 % calcio) que en lactosuero. Por otro lado, aun cuando el lactosuero esté limitado en nutrientes como sustrato, el alto incremento de la biomasa es posible que esté asociado al efecto del ultrasonido de potencia alta.



**Tabla 6.** Incremento (%) de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero ultrasonificado a través del tiempo de fermentación.

$t_f$ (h)	$m_{KG}$ (g L <sup>-1</sup> )	$m_{KG,i}$ (g L <sup>-1</sup> )	$w_{KG,i}$ (%)
0	30.00 ± 0.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4	31.55 ± 0.4	1.55 ± 0.39	5.17 ± 1.29
8	32.93 ± 0.3	2.93 ± 0.27	9.77 ± 0.91
12	34.16 ± 1.1	4.16 ± 1.06	13.87 ± 3.54
16	35.07 ± 0.7	5.07 ± 0.73	16.90 ± 2.44
20	35.45 ± 1.2	5.45 ± 1.16	18.17 ± 3.88
24	35.97 ± 0.2	5.97 ± 0.23	19.90 ± 0.76
28	38.31 ± 0.3	8.31 ± 1.19	27.70 ± 3.31
32	37.59 ± 0.5	7.59 ± 0.49	25.30 ± 1.64
36	36.17 ± 0.5	6.17 ± 0.51	20.57 ± 1.71
40	35.22 ± 0.4	5.22 ± 0.35	17.40 ± 1.15

Los datos muestran los valores de las medias ± desviación estándar.

$t_f$  = tiempo de fermentación.

$(m_{KG})$  = crecimiento de la biomasa de granos de kéfir.

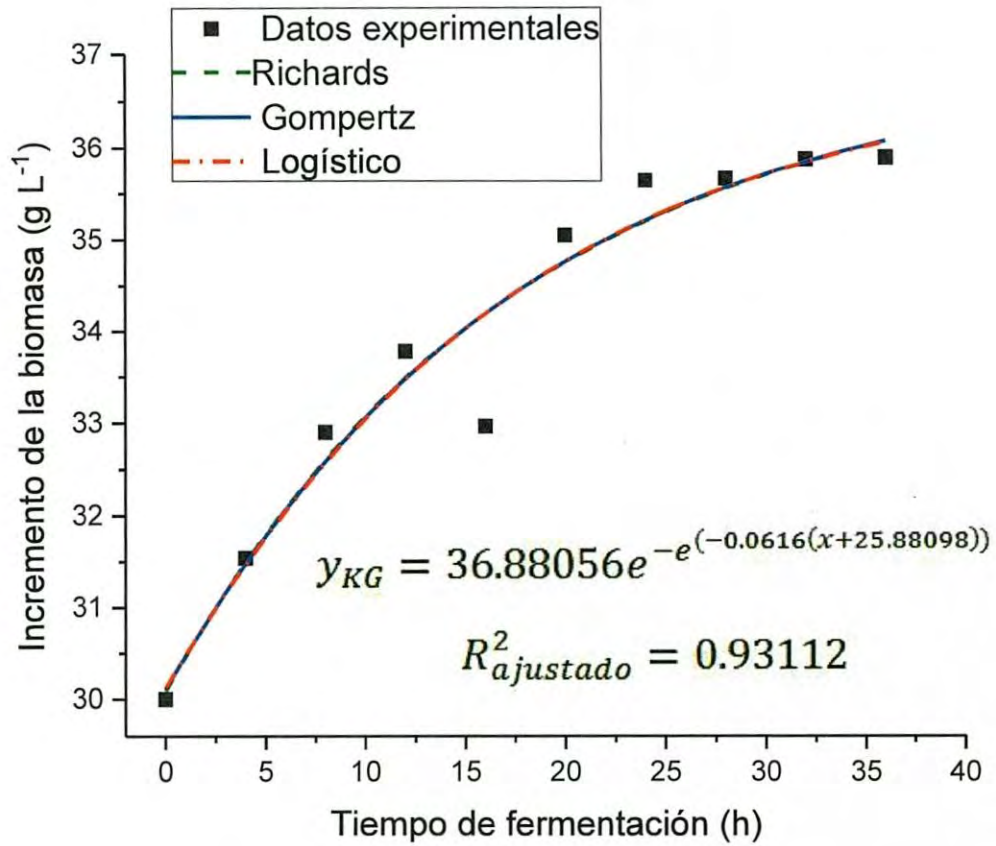
$(m_{KG,i})$  = incremento de la biomasa de granos de kéfir.

$(W_{KG,i})$  = porcentaje del incremento de granos de kéfir.

Investigaciones previas sugieren que este tipo de ultrasonido modifica la conformación de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas durante los procesos de hidrólisis. Güzey *et al.* (2006) reportaron el aumento de  $\alpha$ -hélices y la disminución de  $\beta$ -plegadas y giros  $\beta$  de proteínas sérica bovina tras haberla ultrasonificado a 20 °C, 20 W cm<sup>-2</sup>, 45 min. Esto demuestra cambios en la estructura conformacional de las proteínas. Además, se ha demostrado que esta tecnología emergente incrementa el área específica superficial libre de los grupos sulfhidrilos, disminuye el tamaño de partícula y tiende a formar agregados (Jambrak *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2017). Esto como resultado del efecto de la cavitación acústica sobre los enlaces puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, lo que podría exponer más sitios hidrolizables que al ser reconocidos por los sitios activos de las enzimas generan un mayor grado de hidrólisis (Ozuna *et al.*, 2015; Abdualrahman *et al.*, 2017). En consecuencia, esta condición podría potencializar el metabolismo de los microorganismos que conforman los granos de kéfir generando mayor concentración de biomasa.

### **Análisis del incremento de la biomasa mediante la aplicación de modelos matemáticos**

El incremento de la biomasa fue modelado utilizando las ecuaciones de Richards, Gompertz y Logístico. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 4 y 5. Los datos experimentales se ajustan satisfactoriamente a los modelos matemáticos. Los datos obtenidos del incremento de la biomasa en lactosuero fermentado presentaron los mejores ajustes utilizando los modelos Gompertz y Logístico, con una R<sup>2</sup> ajustada 0.9311 y 0.9309, respectivamente (Figura 4).



**Figura 4.** Modelos matemáticos del incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero.

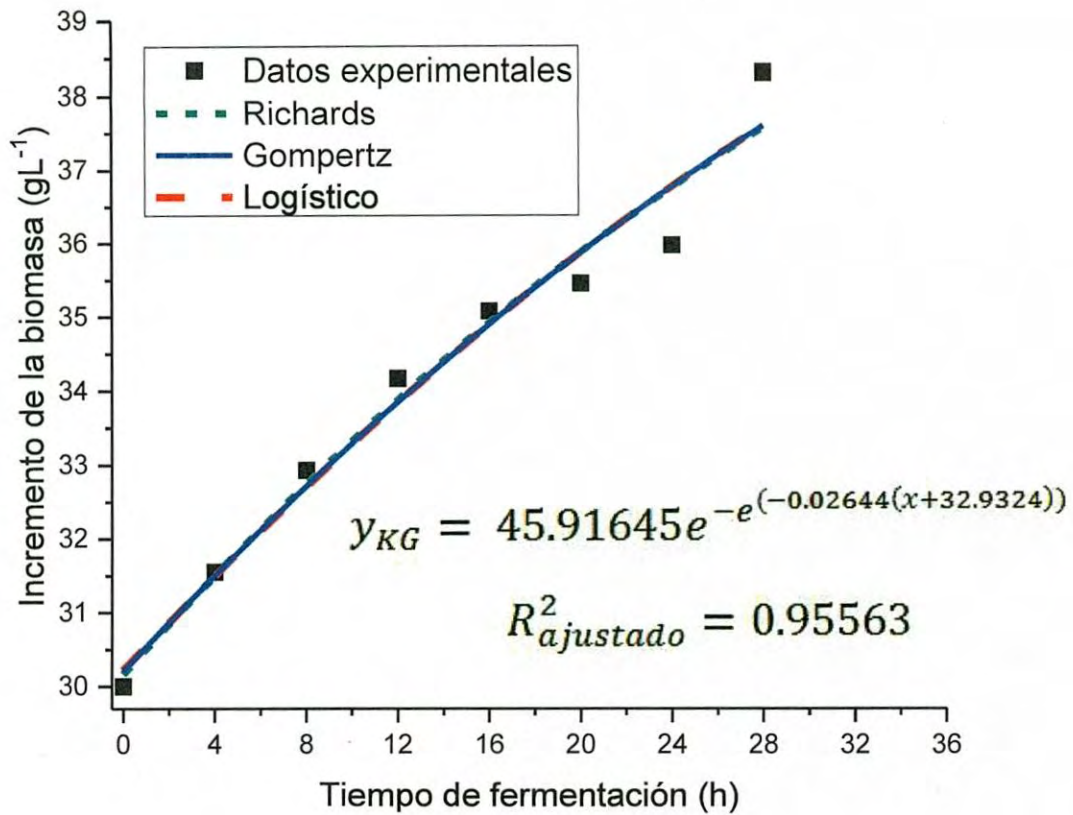


Figura 5. Modelos matemáticos del incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero previamente ultrasonificado.

Ambos modelos sugieren que la máxima biomasa alcanzada fue de  $36.88 \text{ g L}^{-1}$  (Gompertz) y  $36.78 \text{ g L}^{-1}$  (Logístico).

Por otro lado, los datos experimentales del incremento de la biomasa inoculada en el lactosuero previamente ultrasonificado se ajustaron mejor a los modelos matemáticos que los del tratamiento sin ultrasonido (Tablas 7 y 8). Los modelos de Gompertz y Logístico mostraron una  $R^2$  ajustada de 0.9556 y 0.9549, respectivamente. De los tres modelos utilizados en la modelación de los experimentos, se puede observar en las Tablas 5 y 6 que el modelo Logístico mostró la mayor velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) en el tratamiento con lactosuero ( $\mu_{\max} = 0.067 \text{ h}^{-1}$ ). Zajšek y Goršek (2010) reportaron una  $\mu_{\max}$  de  $0.042 \text{ h}^{-1}$  en leche entera fermentada con  $42 \text{ g L}^{-1}$  por 89 h. Goršek y Tramšek (2008) encontraron que la leche entera adicionada con glucosa ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), inoculada con granos de kéfir ( $75 \text{ g L}^{-1}$ ) y fermentada a  $24 \text{ °C}$  por 36 h presentó una  $\mu_{\max}$  de  $0.022 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$ . Asimismo, en un estudio previo se inocularon 75 g de granos de kéfir activos en leche entera y los incubaron a  $24 \text{ °C}$  por 30 h con agitación rotacional de 90 rpm.

El modelo de Gompertz fue el que mejor ajustó el incremento de biomasa, el cual mostró una  $R^2$  ajustada de 0.995 (Tramšek y Goršek, 2008). Los resultados sugieren que el modelo de Gompertz presentó un mejor ajuste para ambos experimentos y mostró que la  $\mu$  fue 2.31 veces más rápida para el tratamiento con ultrasonido y fermentación.

**Tabla 7.** Resultados de la aplicación de los modelos matemáticos al incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en el lactosuero.

<b>Modelo</b>	$\mu_{\text{máx}}(\text{h}^{-1})$	$m_{\text{KG},0} (\text{g L}^{-1})$	$m_{\text{KG},m} (\text{g L}^{-1})$	$R^2_{\text{ajustado}}$
Logístico	0.0670	30.0	36.78	0.9309
Gompertz	0.0616	30.0	36.88	0.9311
Richards	0.0567	30.0	36.97	0.9199

$\mu_{\text{máx}}$  = velocidad máxima específica de crecimiento celular,

$m_{\text{KG},0}$  = biomasa inicial de granos de kéfir,

$m_{\text{KG},m}$  = estimación máxima de biomasa medida en el tiempo de fermentación

**Tabla 8.** Resultados de la aplicación de los modelos matemáticos al incremento de la biomasa de los granos de kéfir inoculados en lactosuero previamente ultrasonificado.

Modelo	$\mu_{\text{máx}}(\text{h}^{-1})$	$m_{\text{KG},0} (\text{g L}^{-1})$	$m_{\text{KG},m} (\text{g L}^{-1})$	$R^2_{\text{ajustado}}$
Logístico	0.0337	30.0	44.53	0.9549
Gompertz	0.0264	30.0	45.92	0.9556
Richards	0.0208	30.0	46.91	0.9453

$\mu_{\text{máx}}$  = velocidad máxima específica de crecimiento celular,

$m_{\text{KG},0}$  = biomasa inicial de granos de kéfir,

$m_{\text{KG},m}$  = estimación máxima de biomasa medida en el tiempo de fermentación

## Cinéticas de los componentes químicos

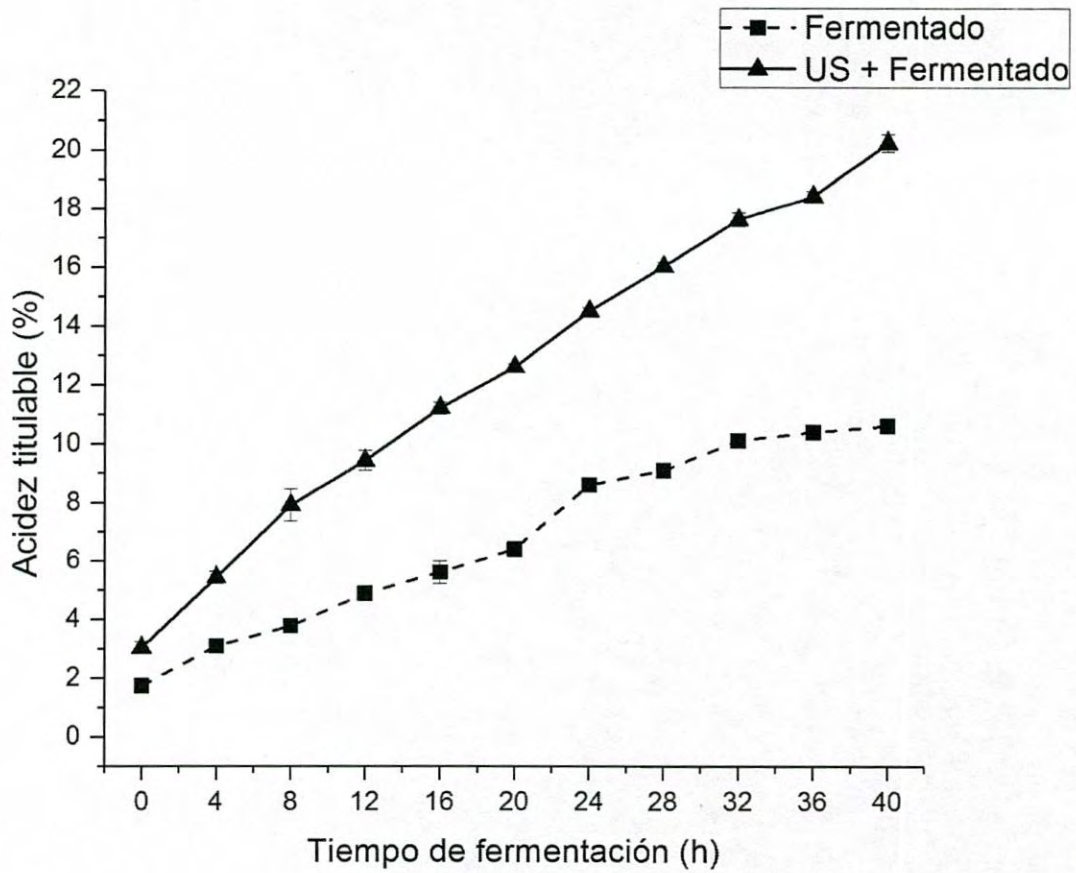
### *Acidez titulable y pH*

La cinética del incremento de la acidez titulable del lactosuero a través del tiempo de fermentación se muestra en la Figura 6. Los resultados muestran que el lactosuero sometido a ultrasonido de alta potencia y fermentado tuvo un efecto significativo ( $P < 0.01$ ) con una mayor capacidad acidificante ( $0.43 \% h^{-1}$ ) en comparación con el lactosuero fermentado ( $0.22 \% h^{-1}$ ). Esta diferencia no fue notoria en los valores resultantes del pH (Figura 7). Por lo que estos resultados sugieren que la estructura química del sustrato pudo haberse modificado por efecto del ultrasonido favoreciendo la actividad metabólica de los microorganismos y con ello el incremento de la producción de ácidos orgánicos.

### *°Bx*

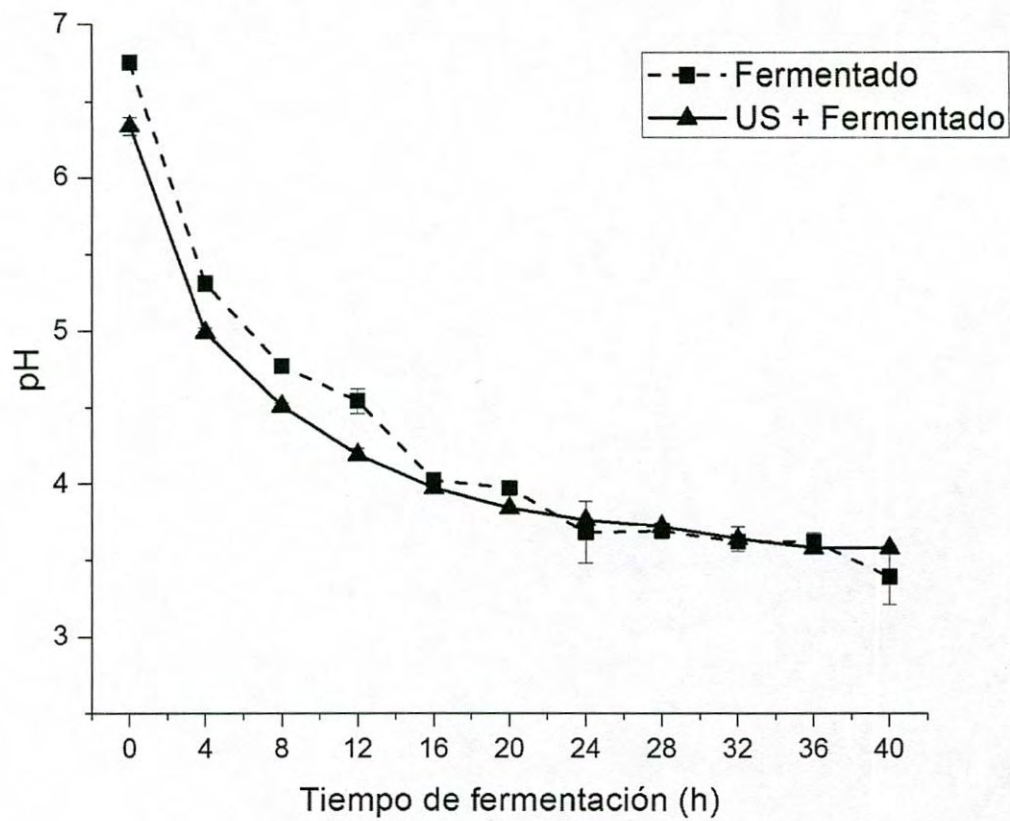
La concentración de sólidos solubles en los tratamientos fue variable durante el tiempo de fermentación (Figura 8). La concentración inicial de °Brix en los tratamientos 2 y 4 fue de  $6.27 \pm 0.06 \%$  y  $6.53 \pm 0.06 \%$ , respectivamente. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.01$ ) a lo largo de la fermentación entre los tratamientos. Es importante resaltar que en esta Figura se puede observar un comportamiento cíclico en donde a las 8, 20 y 32 horas se presenta una disminución considerable de los sólidos solubles acompañada por un consecuente incremento a las 12, 24 y 40 h de fermentación. Este comportamiento pudiera estar asociado al esquema de formación de nuevos granos de kéfir sugerido por Wang *et al.* (2012). En donde se forman pequeños granos a partir de la presencia de diferentes microorganismos y metabolitos





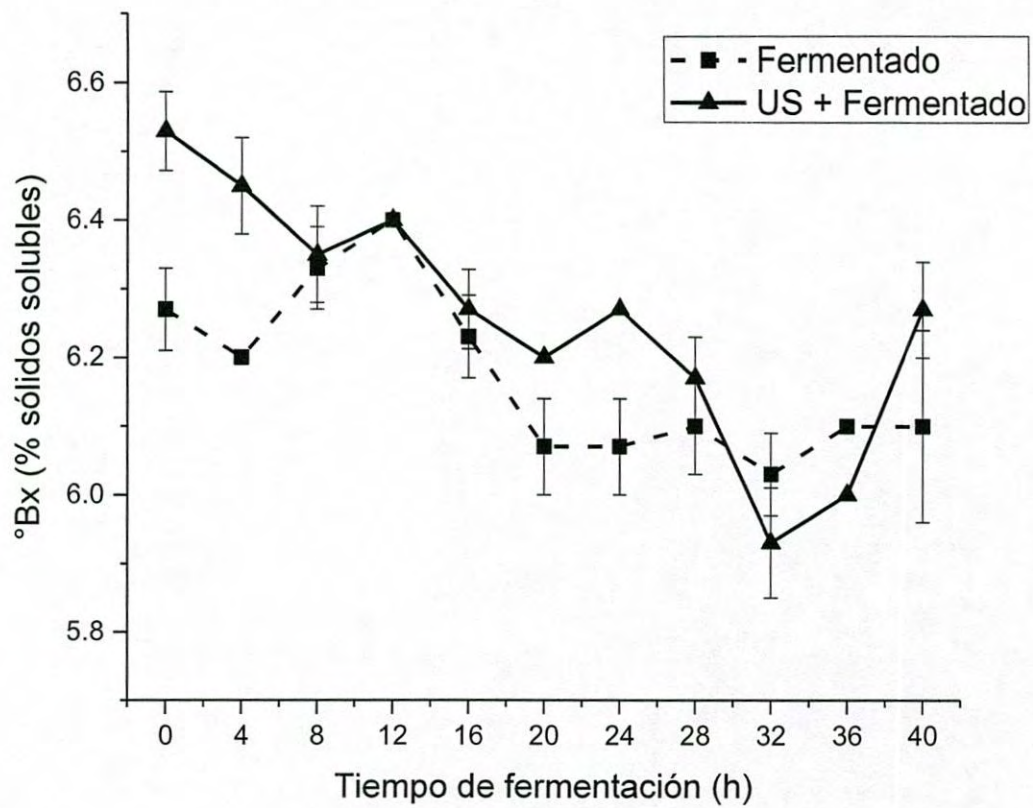
**Figura 6.** Incremento de la acidez titulable a través del tiempo de fermentación.

Los datos muestran los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 7.** Disminución de pH a través del tiempo de fermentación.

Los datos muestran los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 8.** Porcentaje de solidos solubles a través del tiempo de fermentación. Los datos muestran los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar.

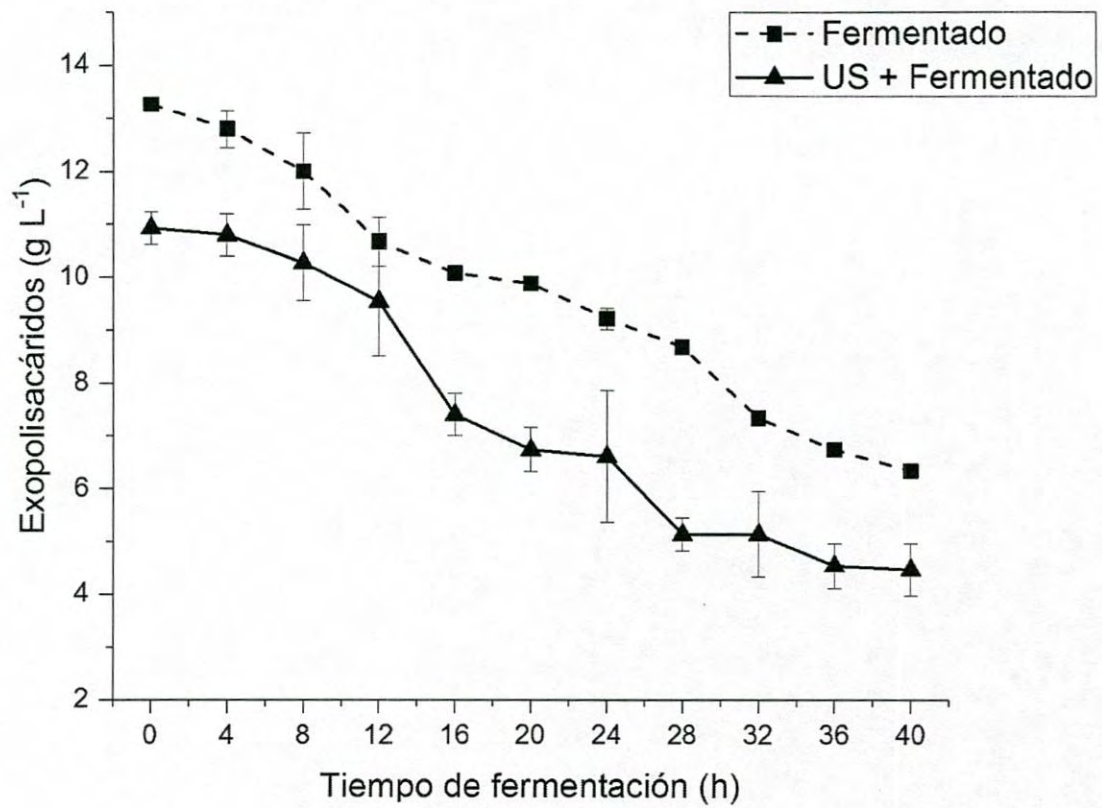
vertidos al medio. Estos últimos pudieran solubilizarse para luego generar películas adhesivas y formar nuevos granos de kéfir de forma periódica.

### *Exopolisacáridos*

La concentración de exopolisacáridos en el lactosuero fue disminuyendo a través del tiempo de fermentación (Figura 9). El lactosuero ultrasonificado y fermentado presentó el mayor decremento de exopolisacáridos, 10.93 g L<sup>-1</sup> inicial y 4.47 g L<sup>-1</sup> final. Al inicio del experimento, el tratamiento del lactosuero fermentado presentó una concentración de 13.2 g L<sup>-1</sup>, la cual fue disminuyendo hasta alcanzar 6.3 g L<sup>-1</sup>. Kök Taş *et al.* (2013) encontraron de igual forma que la concentración de exopolisacáridos decreció en leche (0.1 % grasa) inoculada con granos de kéfir durante la fermentación. Ellos reportaron inicialmente una concentración de 0.108 g L<sup>-1</sup>, misma que decreció hasta 0.077 g L<sup>-1</sup> a los 7 días de refrigeración. Purwandari *et al.* (2007) reportaron una disminución de la concentración de exopolisacáridos en yogurt a través de la vida de anaquel.

### **Composición química**

Los resultados de la composición química de los tratamientos a las cero y 40 h se presentan en las Tablas 9 y 10. Éstas muestran la concentración de los parámetros de materia seca, cenizas, °Brix, acidez titulable y pH. Los tratamientos 2 y 4 fueron inoculados con granos de kéfir para posteriormente obtener las muestras al tiempo cero de fermentación. Al tiempo cero, los tratamientos 3 y 4 cuyo lactosuero fue sometido al ultrasonido de potencia alta mostraron los valores más altos de acidez titulable (3.20 ± 0.06 y 3.05 ± 0.20, respectivamente) y más bajos de pH (6.36 ± 0.01 y 6.34 ± 0.06, respectivamente), los cuales fueron diferentes estadísticamente ( $P < 0.01$ ) (Tabla 9).



**Figura 9.** Decremento de exopolisacáridos a través del tiempo de fermentación.

Los datos muestran los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 9.** Resultados de la composición química de los tratamientos a las cero horas de incubación.

TRATAMIENTOS	Materia seca (%)	Cenizas (%)	pH	°Brix	Acidez titulable (%)
1	6.92 ± 0.09Aa	0.57 ± 0.05Aa	6.61 ± 0.01Aa	6.53 ± 0.12Aa	1.39 ± 0.13Aa
2	6.30 ± 0.56Aa	0.57 ± 0.01Aa	6.75 ± 0.01Aa	6.27 ± 0.06Aa	1.74 ± 0.03Aa
3	6.14 ± 0.05Aa	0.55 ± 0.02Aa	6.36 ± 0.01Ba	6.4 ± 0.00Aa	3.20 ± 0.06Ba
4	6.31 ± 0.63Aa	0.541 ± 0.01Aa	6.34 ± 0.06Ba	6.53 ± 0.06Aa	3.05 ± 0.20Ba

Diferentes literales mayúsculas en la misma columna muestran diferencia significativa ( $P < 0.01$ ). Diferentes literales minúsculas en el mismo tratamiento indican diferencia significativa ( $P < 0.01$ ). Los datos muestran los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar.

Bermúdez-Aguirre *et al.* (2009) demostraron que el ultrasonido (0.86, 1.71 y 2.57, 2.85 W cm<sup>-2</sup>, hasta por 30 min) fue capaz de disminuir el pH e incrementar el porcentaje de acidez titulable en leche entera. Sin embargo, el efecto del ultrasonido es contrastante ya que otros estudios no encontraron cambios significativos. Por ejemplo, leche descremada sometida a 20 y 41 W hasta por 60 min no tuvo cambios significativos en el pH (Shanmugam *et al.*, 2012).

Por otro lado, a las 40 h de incubación los valores más bajos de pH los mostraron los tratamientos 2 y 4,  $3.39 \pm 0.18$  y  $3.58 \pm 0.01$ , respectivamente ( $P < 0.01$ ). Además, se observó que el tratamiento en el cual el lactosuero fue ultrasonificado y fermentado presentó la mayor ( $P < 0.01$ ) acidez titulable,  $20.26 \pm 0.29$  % (Tabla 10). Estudios previos han demostrado que el consorcio de microorganismos que conforman los granos de kéfir son homo y heterofermentativos. Güzel-Seydim *et al.* (2000) reportaron que la fermentación de la leche con estos microorganismos podría generar ácidos orgánicos tales como orótico, cítrico, pirúvico, úrico, láctico, acético, butírico, propiónico e hipúrico.

Erkaya *et al.*, 2015 evaluaron el efecto de la termosonicación inoculando *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en leche entera hasta alcanzar un pH de 4.6. Posteriormente, las muestras termosonicadas a 35 kHz durante 3 min a 70 °C presentaron un incremento significativo del porcentaje de acidez titulable.

Los cambios en la composición química al inicio y al final de la incubación también fueron analizados estadísticamente. Los parámetros donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ) fueron pH, acidez titulable y cenizas.

R. T 190250

**Tabla 10.** Resultados de la composición química de los tratamientos a las 40 horas de incubación.

TRATAMIENTOS	Materia seca (%)	Cenizas (%)	pH	°Brix	Acidez titulable (%)
1	6.37 ± 0.1Aa	0.53 ± 0.02Aa	6.50 ± 0.02Aa	6.33 ± 0.15Aa	5.62 ± 0.13Ab
2	6.30 ± 0.6Aa	0.46 ± 0.01Ab	3.39 ± 0.18Cb	6.00 ± 0.20Aa	10.61 ± 0.15Bb
3	6.86 ± 0.1Aa	0.51 ± 0.01Aa	4.86 ± 0.05Bb	6.23 ± 0.06Aa	5.02 ± 0.75Ab
4	6.47 ± 0.1Aa	0.50 ± 0.01Aa	3.58 ± 0.01Cb	6.27 ± 0.15Aa	20.26 ± 0.29Cb

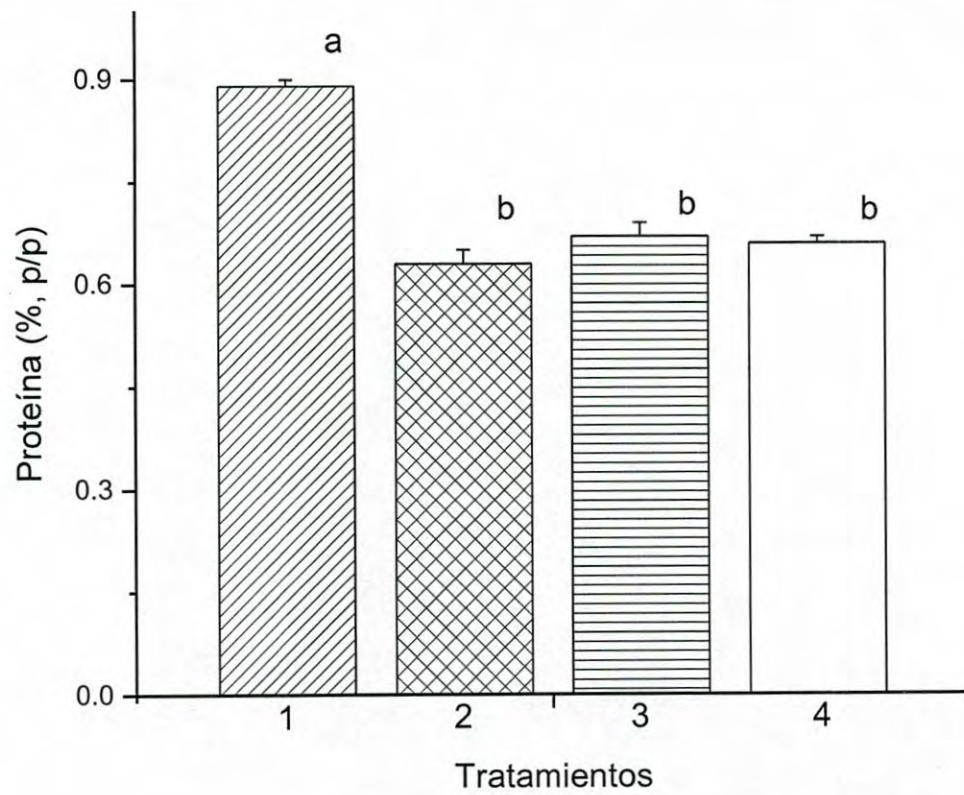
Diferentes literales mayúsculas en la misma columna muestran diferencia significativa ( $P < 0.01$ ). Diferentes literales minúsculas en el mismo tratamiento indican diferencia significativa ( $P < 0.01$ ). Los datos muestran los valores de las medias ± desviación estándar.



Los valores más bajos de pH fueron presentados en el lactosuero fermentado y fermentado-ultrasonificado,  $3.39 \pm 0.18$  y  $3.58 \pm 0.01$ , respectivamente. Londero et al., (2011) reportaron valores de pH muy similares en suero en polvo ( $3.65 \pm 0.09$ ), lactosuero ( $3.54 \pm 0.06$ ) y lactosuero ovino ( $3.39 \pm 0.04$ ) previamente fermentados con 10% (p/v) de granos de kéfir. La actividad acidificante de las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas generó un incremento de la acidez titulable y un decremento del pH (Figuras 6 y 7).

La disminución de la concentración de cenizas al final de la fermentación fue de 0.11 %. Esta diferencia se presentó en el lactosuero fermentado, lo cual sugiere que los minerales fueron utilizados a través del tiempo de fermentación como parte de los procesos metabólicos de los microorganismos que conforman los granos de kéfir. Londero *et al.* (2011) reportaron una disminución de 0.11 % de cenizas después de 24 h de fermentación de lactosuero en polvo inoculado con 10 % (p/v) de granos de kéfir. Por otro lado, el efecto de los tratamientos sobre la materia seca no tuvo diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.01$ ).

El efecto de los tratamientos sobre la concentración de proteína del lactosuero a las 40 horas de incubación se muestra en la Figura 10. El lactosuero sin ultrasonificar ni fermentar utilizado como control presentó una concentración de 0.89 % (p/p), mientras que el fermentado, ultrasonificado y ultrasonificado-fermentado presentaron 0.63, 0.67 y 0.66 % (p/p), respectivamente. Por lo que, los resultados demostraron que la aplicación del ultrasonido de potencia alta y/o la actividad metabólica de los microorganismos de los granos de kéfir disminuyeron significativamente ( $P < 0.01$ ) la concentración de la proteína. Londero *et al.* (2011) reportaron una disminución de 0.07 % en la concentración de proteínas a las 24 h de fermentación de lactosuero en polvo reconstituido al 10 % (p/v) inoculado con 10 % (p/v) de granos de kéfir.



**Figura 10.** Efecto de los tratamientos sobre la concentración de la proteína a las 40 horas de incubación.

Diferentes literales indican diferencia significativa ( $P < 0.01$ ).

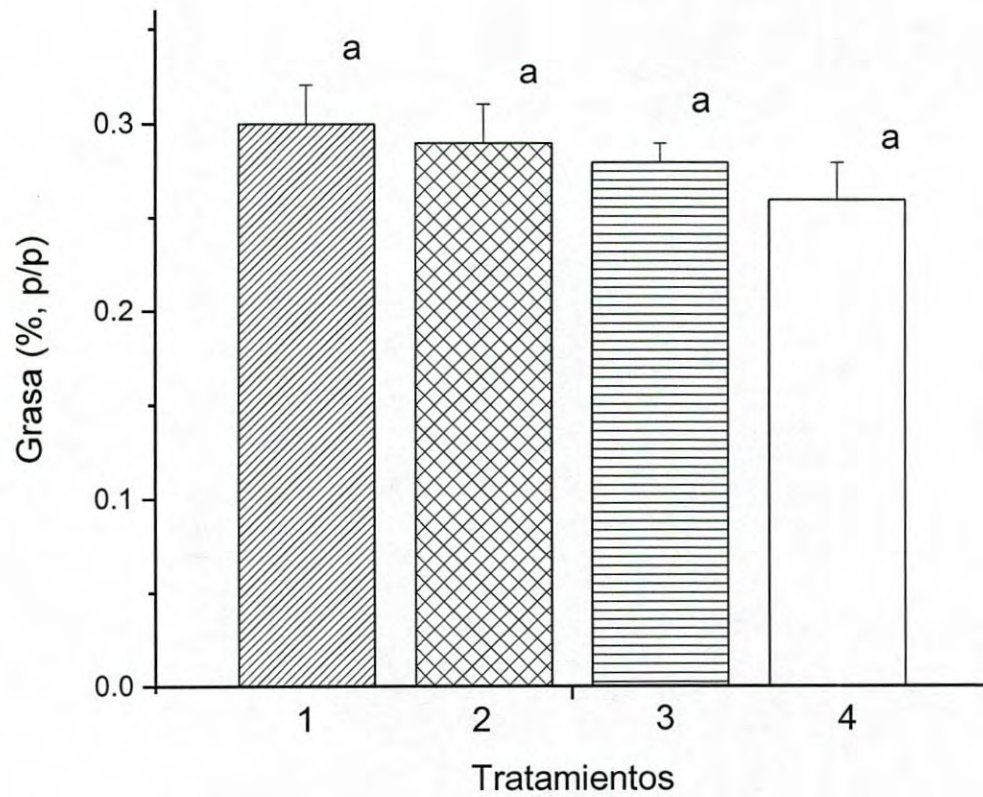
Los datos muestran los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar.

Asimismo, Kök-Taş *et al.* (2013) encontraron una disminución de 0.06 % (p/v) en la concentración de proteína a los 7 días de fermentación de leche (0.1 % grasa) mantenida en refrigeración. Por otro lado, Cameron *et al.* (2009) no encontraron una disminución significativa en el porcentaje de proteína en leche pasteurizada sometida a ultrasonido de alta intensidad (750 W, 20 kHz por 1-10 min). Esto denota que es indispensable explorar con mayor profundidad el efecto del ultrasonido de potencia alta y correlacionarlo con las condiciones para entender la modificación en la composición química.

Los resultados del efecto de los tratamientos sobre la concentración de la grasa del lactosuero a las 40 horas de incubación se muestran en la Figura 11. Aun cuando no hubo diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.01$ ) en la concentración de la grasa, se observó una mayor disminución asociada al efecto de la ultrasonicación y fermentación (0.04 %, p/p). Satir y Guzel-Seydim, (2016) encontraron que la concentración de la grasa de la leche fermentada (2 % inóculo) con granos de kéfir por 20 horas decreció 0.03 %.

### **Modificación de la viscosidad**

El lactosuero sometido a los diferentes tratamientos mostró una disminución en la viscosidad a las 40 horas de incubación (Tabla 11). Estudios previos han reportado una tendencia decreciente de la viscosidad de la leche fermentada con granos de kéfir a través del tiempo de refrigeración (Bensmira *et al.*, 2010; Kök Taş *et al.*, 2013). De acuerdo con Bensmira *et al.* (2010), la disminución de la viscosidad después de 30 h de incubación podría estar asociada con el aumento de glicohidrolasas capaces de disminuir la concentración de exopolisacáridos en el medio. En este estudio la concentración de exopolisacáridos presentó un comportamiento decreciente durante la fermentación, lo que podría estar relacionado con los valores de viscosidad.



**Figura 11.** Efecto de los tratamientos sobre la concentración de la grasa a las 40 horas de incubación.

Diferentes literales indican diferencia significativa ( $P < 0.01$ ).

Los datos muestran los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 11.** Resultados de la viscosidad del lactosuero a las 40 horas de incubación.

<b>Tratamiento</b>	<b>Viscosidad (mPa·s)</b>
Testigo	$2.06 \pm 0.01^a$
Fermentado	$1.95 \pm 0.01^b$
US	$1.89 \pm 0.01^c$
US + Fermentado	$1.97 \pm 0.01^b$

Los datos muestran los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar.

Diferentes literales indican diferencia estadística ( $P < 0.01$ ).

## **CONCLUSIONES**

En este estudio se observó que la aplicación de ultrasonido de potencia alta sobre el suero de la leche incrementó la concentración de la biomasa de los granos de kéfir y disminuyó el tiempo de fermentación significativamente.

El modelo matemático de Gompertz presentó el mejor ajuste en la cinética del crecimiento de la biomasa tanto en el lactosuero fermentado como en el ultrasonicado y fermentado.

El ultrasonido de potencia alta incrementó los valores de la acidez titulable, disminuyó los de pH y exopolisacáridos, mientras que no se observó un efecto significativo en los parámetros de materia seca y °Brix.

Asimismo, el ultrasonido de potencia alta tuvo un efecto significativo decreciente en los valores de viscosidad del lactosuero al final del tiempo de fermentación.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda explorar la actividad biológica de los péptidos presentes en el kéfir elaborado con lactosuero y ultrasonicado con potencia alta. Así como aislarlos y adicionarlos a otros alimentos con el objetivo de hacerlos funcionales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S., y Salem, A. (2009). Factors affecting the functional properties of whey protein products: A review. *Food Reviews International*, 25(3), 251-270.
- Abdualrahman, M. A, Y., Zhou, C., Zhang, Y., El-Gasim Ahmed Yagoub, A., Ma, H., Mao, L., y Wang, K. (2017). Effects of ultrasound pretreatment on enzymolysis of sodium caseinate protein: Kinetic study, angiotensin-converting enzyme inhibitory activity, and the structural characteristics of the hydrolysates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6).
- Adolfo, R., Huertas, P., y Parra, R. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos, 62(1), 4967-4982.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., y Afreen, A. (2013). Kefir and Health: A Contemporary Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 422-434.
- Aider, M., D. Halleux y I. Melnikova. (2009). Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(3), 334-341.
- Angulo, L., Lopez, E., y Lema, C. (1993). Microflora present in kefir grains of the Galician region (Northwest of Spain). *J. Dairy Res*, 60, 263-267.
- Apar, D. K, Demirhan, E., Özel, B., y Özbek, B. (2017). Kefir Grain Biomass Production: Influence of Different Culturing Conditions and Examination of Growth Kinetic Models. *Journal of Food Process Engineering*, 40(1). 1-9.
- Arslan, S. (2015). A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *Journal of Food*, 13(3). 340-345.

- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., ARIAS, A., Pérez, O.E., y Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472.
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vikhu, K., y Versteeg, C. Kees. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionally: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 155-160.
- Ashokkumar, M., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., Lee, J., Palmer, M., y Zisu, B. (2010). The ultrasonic processing of dairy products – An overview. *Dairy Science y Technology*, 90(2-3), 147-168.
- Awards, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., y Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *FRIN*, 48(2), 410-427.
- Bekatorou, A., Psarianos, C., Koutinas, A.A., (2006). Production of food grade yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 407–415.
- Bensmira, M., Nsabimana, C., y Jiang, B. (2010). Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. *LWT – Food Science and Technology*, 43(8), 1180-1184.
- Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M. G., Mawson, R., y Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Modelling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(2), 172-178.
- Bhaskaracharya, R., Kentish, S.E., Ashokkumar, M., (2009). Selected applications of ultrasonics in food processing. *Food Engineering Reviews*, 1, 31–49.



- Boyaval, P. y Goulet, J. (1988). Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca- alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme Microbiology and Technology*, 10, 725–728.
- Cameron, M., McMaster, L.D., et al., (2009). Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Sci. Technol*, 89, 83–98.
- Cameron, M., McMaster, L. D., y Britz, T. J. (2010). Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Science and Technology*, 90(1), 119-119.
- Camino, N.A., Pérez, O.E., Pilosof, A.M.R., (2009). Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 23 (4), 1089–1095.
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., y Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, 445-446, 385-396.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., y Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(5), 975–983.
- Charlebois, S., y Haratifar, S. (2015). The perceived value of dairy product traceability in modern society: An exploratory study. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 3514-3525.
- Chen, M. J., Liu, J. R., Sheu, J. F., C. W., y Chuang, C. L. (2006). Study on skin care properties of milk kefir whey. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(6), 905-908.

- Chen, H. C., S. Y. Wang, y M. J. Chen. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol*, 25, 492-501.
- Chiarini, L., Mara, L. y Tabacchioni, S. (1992). Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 461–464.
- Dermihan, E., Apar, D. K., Payer, G., y Özbek, B. (2011). A modeling study on kefir grain biomass growth: Influence of various minerals. *International Journal of Dairy Technology*, 64(3), 402-407.
- Demirhan, E., Gürses, B., Yalçın, B. E., Apar, D. K., y Özbek, B. (2013). Influence of vitamin (B1, B6, B9, B12, C) and ions on kefir grain biomass growth. *Food Science and Biotechnology*, 22(4), 1007-1013.
- Dimitrellou, D., Kourkoutas, Y., Banat, I. M., Marchant, R., y Koutinas, A. A. (2007). Whey-cheese production using freeze-dried kéfir culture as a starter. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1170-1183.
- Dimitrellou, D., Tsaouski, K., Kourkoutas, Y., Panas, P., Kanellaki, M. y Koutinas, A. A. (2008). Fermentation efficiency of thermally dried immobilized kefir on casein as starter culture. *Process Biochem*, 43, 1323–1329.
- Erkaya, T., Başlar, M., Şengül, M., y Ertugay, M. F, (2015). Effect of thermosonication on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of ayran during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 406-412.
- Ertekin, B. y Guzel-Seydim, Z.B. (2010). Effect of fat replacers on kefir quality. *J Sci Food Agric*, 90, 543–548.

- Ewe, J. A., Wan-Abdullah, W. N., Bhat R, Karim A. A., Liong, M. T. (2012). Enhanced growth of lactobacilli and bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk upon ultrasound-treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 160-173.
- Fernandes, M., R. Fornari, M. Mazutti, D. Oliveira, F. Ferreira, A. Cichoski, R. Cansian, M. Luccio y H. Treichel. (2009). Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 119–123.
- Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pinho, O., Monteiro, D., Faria, S., Cruz, S. y Perreira, A. (2010). Effect of kefir grains on proteolysis of major milk protein. *J. Dairy Sci*, 93, 27–31.
- Fialho, A. M., Martins, L. O., Donval, M. L., Leitao, J. H., Ridout, M. J., Jay, J. J., Morris, V. J. y Sa3-Correia, I. (1999). Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2485–2491.
- Floren, H. K., Sischo, W. M., Crudo, C., y Moore, D. A. (2016). Use of the Brix refractometer to evaluate milk replacer solutions for calves. *Journal of Animal Science*, 94(5), 714.
- Floros, J. D., Liang, H., 1994. Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. *Food Technology*, 48 (12), 79-84.
- Gajendragadkar, C. N., y Gogate, P. R. (2016). Intensified recovery of valuable products from whey by use of ultrasound in processing steps - A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 102-118.
- Garrote, G. L., A. G. Abraham, y G. L. De Antoni. (1997). Preservation of kefir grains, a comparative study. *Lebensm.-Wiss. Technol*, 30, 77–84.

- Gassem, M. A., Schmidt, K. y Frank, J. (1997). Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science*, 62, 171–173.
- Gill, H. S. (1998). Stimulation of the immune system by lactic cultures. *International Dairy Journal*, 8, 535-544.
- Gogate, P. R., Trayal, R. K., y Pandit, A. B. (2006). Cavitation: A technology on the horizon. *Current Science*, 91(1) 35-46.
- Golowczyc, M. A., M. J. Gugliada, A. Hollmann, L. Delfederico, G. L. Garrote, A. G. Abraham, L. Semorile, y G. De Antonia. (2008). Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: Potential use as probiotic. *J. Dairy Res.* 75, 211–217.
- Goršek, A., y Tramšek, M. (2008). Kefir grains production – An approach for volume optimization of two-stage bioreactor system. *Biochemical Engineering Journal*, 42(2), 153-158.
- Güzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K., y Bodine, A. B. (2000). Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir during Fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(1), 35-43.
- Güzel-Seydim, Z. B., Kök-Taş, T., Greene, A. K., y Seydim, A. C., (2011). Review: Functional Properties of Kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 261-268.
- Güzel-Seydim, Z., Kök-Taş, T., Ertekin-Filiz, B., y Seydim, (2011). Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 94(3), 1239-42.

- Güzey, D., Gülserenm I., Bruce, B., y Weiss, J. (2006). Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 669-677.
- Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., y Ibanez, F. C. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90, 613–620.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., y Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 281-287.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Paniwnyk, L., y Herceg, Z. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 121(1). 15-23.
- Jelen, P., Roginski, H., Fuquay, J., Fox, P., (2003). Whey processing: utilization and products. *Encycl. Dairy Sci.*, 2739–2745.
- Kaptan, B., Kayisoglu, S., y Oksuz, O. (2015). Mathematical Modeling of pH Variation as a Function of Temperture and Time in Kefir Production. *American Journal of Food Science and Nutrition Research*, 2(2), 57-61.
- Kentish, S., Ashokkumar, M., (2011). The physical and chemical effects of ultrasound. In: Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer Science Business Media, New York, pp. 1–12.
- Knorr, K., Zenker, M., V., y Lee, D. U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15(5), 261-266.

- Kök-Taş, T., Seydim, A. C., Ozer, B., y Güzel-Seydim, Z. B. (2013). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 780-9.
- Kosseva, M. R., Panesar, P. S., Kaur, G., y Kennedy, J. F. (2009). Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(5), 437-447.
- Koutinas, A. A., Athanasiadis, I., Bekatorou, A., Psarianos, C., Kanellaki, M., Agouidis, N. y Blekas, G. (2007). Kefir-yeast technology: Industrial scale-up of alcoholic fermentation of whey, promoted by raisin extracts, using kefir- yeast granular biomass. *Enzyme Microbial. Technol.*, 41,576–582.
- Krischke, W., Schroder, M. y Trosch, W. (1991). Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilised *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 573–578.
- Kwon, Y., E. Apostolidis, y K. Shetty. (2006). Anti-diabetes function- ality of kefir culture-mediated fermented soymilk supplemented with rhodiola extracts. *Food Biotechnol.* 20, 13–29.
- Lin, Je-Ruei., C. W. (2000). Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *JFS: Food Microbiology and Safety Production*, 65(4), 716-719.
- Linton, R. H., Carter, W., Pierson, M., y Hackney, C. (1994). Use of a modified Gompertz equation to model non-linear survival curves and predict temperatura, pH and sodium chloride effects for *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 58(9), 946-954.
- Londero, A., Quinta, R., Abraham, A. G., Sereno, R., De Antoni, G., y Garrote, G. L. (2011). Inhibitory Activity of Cheese Whey Fermented with Kefir Grains. *Journal of Food Protection*, 74(1), 94-100.

- Luque de Castro, M. D., y Priego-Capote, F. (2007). Ultrasound-assisted preparation of liquid samples. *Talanta*, 72(2), 321-334.
- Malbaša, R. V., Milanović, S. D., Lončar, E. S., Djurić, M. S., Carić, M. D., Iličić, M. D., y Kolaro, L. (2009). Milk-based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chem.*, 112, 178–184.
- Mason, T. J. (1990). *Sonochemistry: The uses of ultrasound in chemistry. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry.*
- Mason, T. J., Paniwnyk, L., y Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 253-260.
- Mason, T. J., Chemat, F., y Ashokkumar, M. (2014). Power ultrasonics for food processing. *Power Ultrasonics: Applications of High-Intensity Ultrasound*, 815-843.
- Mason, T. J., Chemat, F., y Ashokkumar, M. (2015). 27 – Power ultrasonics for food processing BT – *Power Ultrasonics*, 815-843.
- McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*, 6(9), 293-299.
- Musielak, G., Mierzwa, D., y Kroehnke, J. (2016). Food Drying enhancement by ultrasound – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 56,126-141.
- Nguyen, T. M. P., Lee, Y. K., y Zhou, W. (2012). Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacterial in milk fermentation. *Food Chemistry*, 130(4), 866-874.

- O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P. y Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 358-367.
- Ojha K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P. y Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34,410-417.
- Ozuna, C., Paniagua-Martínez, I., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L. y Amaya-Llano, S. L. (2015). Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein Hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research Internacional*, 77, 685-696.
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N., Bunko, K., (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem.*, 105, 1–14.
- Panesar P. S., Kumari, S., Panesar, R. (2013). Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. *Critical reviews in biotechnology*, 33(4), 345-364.
- Papapostolou, H., Bosnea, L.A., Koutinas, A. A., y Kanellaki, M. (2008). Fermentation efficiency of thermally dried kefir. *Bioresour. Technol.*, 99, 6949–6956.
- Papavasiliou, G., Kourkoutas, Y., Rapti, A., Sipsas, V., Soupioni, M. y Koutinas, A. A. (2008). Production of freeze-dried kefir culture using whey. *Int. Dairy J.*, 18, 247–254.
- Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, L. y Laopaiboon, L. (2017). Kinetic models for batch ethanol productions from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models. *Journal of Biotechnology*, 243, 69-75.



- Piermaria, J. A., M. L. de la Canal, y A. G. Abraham. (2008). Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocoll.*, 22,1520–1527.
- Piermaria, J. A., A. Pinotti, M. A. Garcia, y A. G. Abraham. (2009). Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocoll.*, 23, 684–690.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S. y Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31(2), 593-606.
- Pogačić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., y Samaržija, D. (2013). Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*, 63(1), 3-4.
- Purwandari, U., Shah, N. P., y Vasiljevic, T. (2007). Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. *International Dairy Journal*, 17(11), 1344-1352.
- Reddy, G.V., Friend, B. A., Shahani, K. M., y Farmer, R. E. (1983). Antitumor activity of yogurt components. *J. Food Prot.* 46, 8–11.
- Riener, K., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J., y Lyng, J. G. (2009). Characterisation of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. *International Dairy Journal*, 19(4), 269-272.
- Rimada, P. S. y Abraham, A. G. (2001). Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 68(04).
- Rimada, P. S., y Abraham, A. G. (2006). Kefiran improves rheological properties of glucono-delta-lactone induced skim milk gels. *Int. Dairy J.* 16, 33–39.

- Rodríguez-Figueroa, J. C., Noriega-Rodríguez, J. A., Lucero-Acuña, A. y Tejada-Mansir, A. (2017). Avances en el estudio de la bioactividad multifuncional del kefir. *Interciencia*, 42(6), 347-354.
- Sanmartín, B., Díaz, O., Rodríguez-Turienzo, L. y Cobos, A. (2012). Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. *Small Ruminant Research*, 134, 1-7.
- Satir, G. y Guzel-Seydim, Z. B. (2016). How kefir fermentation can affect product composition? *Small Ruminant Research*, 134, 1-7.
- Seydim, Z. B. (2001). Biochemical, microbial and fermentative properties of kefir. *PhD Diss. Clemson University, Clemson, SC.*
- Shanmugam, A., Chandrapala, J., y Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 251-258.
- Shen, X., Zhao, C. y Guo, M. (2017). Effects of high intensity ultrasound on acid-induced gelation properties of whey protein gel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39, 810-815.
- Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M., y Aibara, K. (1982). Antitumor activity in mice orally administered polysaccharide from kefir grain. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 35, 75–80.
- Silva, K.R., Rodrigues, S.A., Filho, L.X., Lima, A.S., (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152, 316–325.
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold.” *International Dairy Journal*, 18(7), 695-704.

- Soria, A. C. y Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 323-331.
- Suslick, K. S., Didenko, Y., Fang, M. M., Hyeon, T., Kolbeck, K. J., McNamara III, W. B., Mdleleni, M. M., Wong, M. (1999). Acoustic cavitation and its chemical consequences, *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 357, 335-353.
- Svensson, M., Sabharwal, H., Mossberg, A. K., Lipniunas, P., Leffler, H., Svanborg, C., y Linse, S. (1999). Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 6388–6396.
- Tarango-Hernández, S., Alarcón-Rojo, A. D., Robles-Sánchez, M., Gutierrez-Méndez, N. y Rodríguez-Figueroa, J. C. (2015). Short communication: Potential of Fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7635-7639.
- Thompson, L. H y Doraiswamy, L. K. (1999). Sonochemistry: Science and engineering. *Ind. Eng. Chem. Res*, 38, 1215-1249.
- Topuz, E., D. Derin, G. Can, E. Kürklü, S. Çınar, F. Akyan, A. Çevikbaş, R. Dişçi, Z. Durna, B. ŞAKAR, s. Saglam, H. Tanyeri, G. Deniz, U. Gürer, F. Taş, N. Guney y A. Aydın. (2008) Effect of oral administration of kefir on serum proinflammatory cytokines on 5-FU induced oral mucositis in patients with colorectal cancer. *Invest. New Drugs*, 26, 567-572.
- Tramšek, M., y Goršek, A. (2008). Analysis of growth models for batch kefir grains biomass production in rc1 reaction system. *Journal of Food Process Engineering*, 31(6), 754-767.

- Van Geel-Schutten, G. H., Flesch, F., Ten Brink, B., Smith, M. R., y Dijkhuizen, L. (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(6), 697-703.
- Veer, P., Dekker, J. M., Lamars, J. W. J., Kok, F. J., y Schouten, E. G. (1989). Consumption of fermented milk products and breast cancer: A case control study in the Netherlands. *Cancer Res.*, 49, 4020–4023.
- Vercet, A., Burgos, J. y López-Buesa, P. (2001). Manothermosonication of foods and food-resembling systems: Effect on nutrient content and nonenzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 483-489.
- Vinderola, G., G. Perdigon, J. Duarte, E. Farnworth, y C. Matar. (2006). Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kéfir microflora on immune stimulation. *J. Dairy Res.*, 73, 472-479.
- Wang, Chen Kun-Kan, Lo Y. M., Chiang M. L., Chen, H. C., Liu, J. R. (2012). Investigation of microorganisms involved biosynthesis of the kefir. *Food Microbiology*, 32, 274-285.
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D. y Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6), 756-774.
- Zajšek, K., y Goršek, A. (2010). Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora. *Food and Bioprocess Processing*, 88(1), 55-60.

Zeynep B. Guzel-Seydim , Tugba Kok-Tas , Annel K. Greene y Atif C. Seydim  
(2011) Review: Functional Properties of Kefir, *Critical Reviews in Food  
Science and Nutrition*, 51(3), 261-268.

Zheng, L., Sun, D.-W., (2006). Innovative applications of power ultrasound  
during food freezing processes: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 17  
(1), 16–23.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts. F. M. y Van't Riet, K. (1990).  
Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental  
Microbiology*, 56(6), 1875-1881.