

# Control y regulación del PH en una fermentación láctica utilizando carbonato de calcio como regulador y microbiota de granos de Kefir como agente biológico

## *Control and Regulation of pH in a Lactic Fermentation Using Calcium Carbonate as a Regulator and Microbiota of Kefir Grains as Biological Agent*

Fermín Humberto Arévalo Ortiz,\* Armando Quispe Cáceres\*\*

<http://dx.doi.org/10.21503/CienciyDesarrollo.2008.v9.01>

### RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se demostró la posibilidad de controlar el efecto negativo del exceso de acidez que se produce en las fermentaciones lácticas, mediante la utilización del carbonato de calcio como regulador y la microbiota de los granos de Kefir como agente biológico. El carbonato de calcio, aparte de su bajo costo y fácil obtención, parece reunir algunas características especiales para regular el pH de las fermentaciones lácticas, puesto que las bacterias lácticas tienen un pH óptimo de crecimiento alrededor de 4 y dado que el carbonato de calcio recién es soluble solo a un pH inferior a 5. Los ensayos se realizaron utilizando la microbiota de los granos de Kefir, como ya se dijo, debido a que en su gran mayoría son una mezcla simbiótica de bacterias lácticas. Los resultados obtenidos demuestran fehacientemente que el carbonato de calcio es una buena alternativa para controlar el pH de las fermentaciones lácticas, en las que el exceso de acidez puede hacer que los procesos bioquímicos sean inhibidos o se vean afectados por la puesta en marcha, por parte de los microorganismos, de los mecanismos de retroalimentación negativa o feedback negativo.

**Palabras clave:** *acidez, microbiota, granos de Kefir.*

### ABSTRACT

Presently investigation work was demonstrated the possibility to control the negative effect of the acidity excess that takes place in the lactic fermentations, by means of the use of the carbonate of calcium like regulator and the microbiota of the grains of Kefir like biological agent. The carbonate of calcium, apart from its low cost and easy obtaining, seems to gather some special characteristics to regulate the pH of the lactic fermentations, since the lactic bacterias have a good pH of growth around 4 and since the carbonate of calcium newly is soluble alone to an inferior pH at 5. The tests were carried out using the microbiota of the grains of Kefir, I eat it was already said, because in their great majority they are a mixture simbiótica of lactic bacterias. The obtained results demonstrate convincingly that the carbonate of calcium is a good alternative to control the pH of the lactic fermentations, in those that the acidity excess can make that the biochemical processes are inhibited or be affected by the setting in march, on the part of the microorganisms, of the mechanisms of negative feedback or negative feedback

**Key words:** *acidity, microbiota, grains of Kefir.*

\* Profesor de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la UAP.

\*\* Profesor de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la UAP.

## INTRODUCCIÓN

Aunque la biotecnología conlleva el uso potencial de todas las formas de vida, los microorganismos han jugado un papel preponderante en el desarrollo de esta disciplina, y continuarán siendo utilizados ampliamente. Las bacterias lácticas no son ajenas a esta realidad; por el contrario, son ampliamente utilizadas por sus grandes bondades, que, entre otras, nos proveen de carnes y leches fermentadas. Entre las razones para ello debemos mencionar la facilidad de cultivarlas en masa, la extraordinaria velocidad a la que crecen, lo barato de los constituyentes generales de los medios de cultivo utilizados y el gran número de rutas metabólicas que utilizan para su subsistencia, lo que a su vez da lugar a una diversidad de productos potenciales como la producción de biomasa, entre otros (Brown *et al.*(1)). Sin embargo, muchos de estos procesos se ven afectados debido a que los parámetros de fermentación muchas veces no son los adecuados porque son difíciles de controlar o porque son muy costosos. Uno de esos parámetros de suma importancia es el pH, el cual debe ser controlado de tal manera que sea un pH óptimo, es decir, un pH para el cual el crecimiento del o de los microorganismos debe ser óptimo (Scragg(2)).

La microbiota de los granos de Kefir, que generalmente es una mezcla simbiótica de bacterias lácticas y algunas levaduras que en conjunto se asemejan a diminutas coliflores (Sasaki(3); Bourgeois y Larpent(4)), parece ser un agente biológico excepcional para probar, mediante el rendimiento en la producción de biomasa, si el carbonato de calcio puede funcionar como regulador del pH en una fermentación láctica, dado que este compuesto es soluble solo cuando el pH es inferior a 5 (Pons Muzzo(5)) y porque el pH óptimo de las bacterias lácticas está alrededor de 4; por otra parte, el carbonato de calcio es de bajo costo y fácil de obtenerse, puesto que existen variadas fuentes naturales para conseguirlo.

La hipótesis que se plantea en el presente trabajo de investigación es la siguiente: “Es posible controlar el pH de una fermentación láctica utilizando granos de Kefir como agente biológico y carbonato de calcio como regulador”.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Objetivos

- a) Demostrar que el carbonato de calcio puede regular un exceso de acidez en una fermentación láctica y a su vez reflejarlo en un mayor rendimiento de biomasa proveniente de la microbiota de los granos de Kefir.
- b) Determinar el pH de equilibrio que se establece en el medio de cultivo, durante la fermentación, debido a la interacción entre los metabolitos de los granos de Kefir y el carbonato de calcio.

### Fundamento teórico

En todo proceso de fermentación, el control del pH es de suma importancia, puesto que los microorganismos y las enzimas de los microorganismos realizan una mejor actividad a un pH adecuado o más propiamente llamado pH óptimo (Chang,(6) Murray *et al.*,(7) Scragg(2)). En el caso de los granos de Kefir, se sabe que su pH óptimo en leche como medio de cultivo es de 4,4 (Marshall(8)). Entonces, es evidente que para un mejor rendimiento de biomasa de la microbiota de los granos de Kefir es necesario mantener el medio de cultivo lo más cerca posible a este valor de pH. Una manera posible y práctica de poder conseguir este propósito es utilizando carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) como neutralizante del medio, el cual es una sal insoluble en agua, con un pH de 7,0, pero que comienza a solubilizarse a partir de pH 5,0, y haciéndose cada vez más soluble a medida que desciende el pH (Stecher, *et al.*(9)).

Así, es de esperar que el pH del medio de cultivo se mantenga próximo a 4,4, de manera práctica, el mismo que es el pH óptimo para el normal crecimiento de los granos de Kefir, puesto que si consideramos al ácido láctico como el principal causante de la acidez del medio de cultivo, se infiere que a medida que este ácido se vaya formando, seguidamente será neutralizado por el carbonato de calcio para formar lactato de calcio, el cual es una sal soluble en medio ácido y por lo tanto en el medio de cultivo. La cantidad de  $\text{CaCO}_3$  que se debe emplear tiene que estar en función del pH requerido, pero lógicamente tiene que haber una cantidad máxima que racionalmente debe ser utilizada y que debe ser calculada estequiométricamente, en función de la cantidad total de azúcar del medio de cultivo.

### Agente biológico

Microbiota de los granos de Kefir provenientes de cuatro diferentes casas naturistas de la ciudad de Lima.

### Equipo

Biorreactor de 1 000 ml de capacidad construido por el autor, el mismo que se muestra en la figura 1, con su respectivo esquema en la figura 2.



Figura 1. Fotografía del biorreactor utilizado.

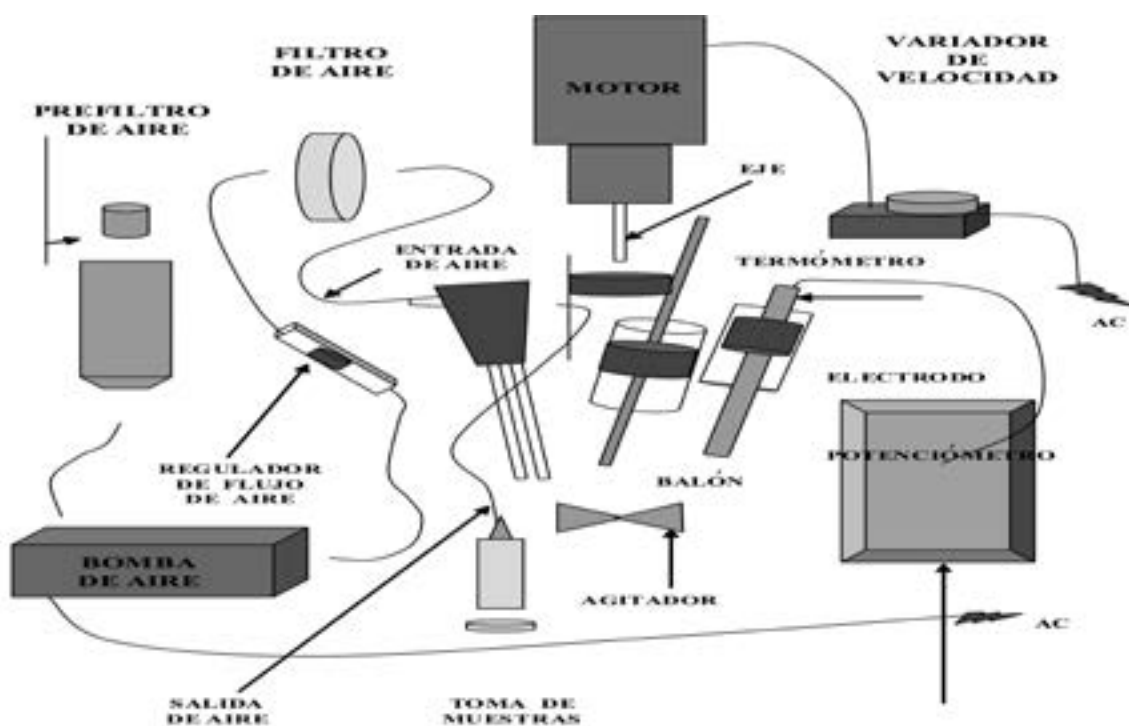


Figura 2. Esquema del biorreactor utilizado

## Recolección del agente biológico

Se recolectaron cuatro muestras de granos de Kefir de cuatro diferentes casas naturistas de la ciudad de Lima. Se tomaron 10 g de cada muestra y se procedió a juntarlas, de tal manera que pasaron a constituir una sola muestra de 40 g.

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

Los 40 g de muestra inicial de los granos de Kefir se cultivaron en leche, a temperatura ambiente (entre 19 °C y 26 °C), iniciándose con una concentración de 5% de agente biológico respecto al medio de cultivo, tal como lo recomienda Sasak<sup>3</sup>, y cambiando el medio de cultivo cada 24 horas, pero siempre reiniciando el proceso con una concentración de 5% de agente biológico respecto al medio de cultivo, hasta obtener unos 100 g de agente biológico, de tal manera que se pudiera contar con una fuente de microbiota de los granos de Kefir homogénea y permanente para los ensayos respectivos.

## Preparación del inóculo

Una vez obtenidos los 100 g o más de cultivo iniciador o starter, los granos de Kefir fueron retirados del medio de cultivo (leche) después de haber cumplido un período de 24 horas de fermentación. Acto seguido, estos granos fueron lavados con agua por tres veces y se dejaron escurrir en un colador, con malla N° 35 ASTM, por espacio de 20 minutos. Los granos de Kefir así obtenidos fueron los que se utilizaron como inóculos.

## Procedimiento experimental

a) Se prepararon 200 ml de una mezcla de melaza de caña y suero de leche, de tal manera que contuviera 7% de azúcares totales como sustrato de fermentación, y se fermentaron en

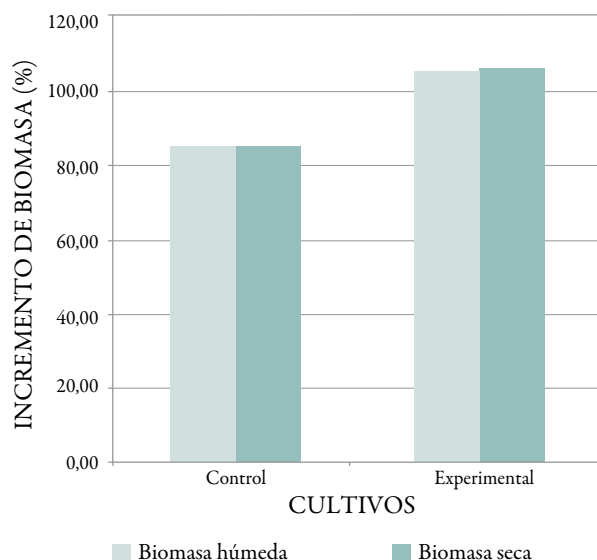
el reactor con una velocidad de agitación de 60 rpm a temperatura ambiente y por espacio de 48 horas, con 8 g de inóculos (4%) y sin la adición de carbonato de calcio.

- b) Posteriormente, se prepararon 200 ml del mismo medio de cultivo, es decir, una mezcla de melaza de caña y suero de leche que contuviera 7% de azúcares totales como sustrato de fermentación, y se fermentaron en el mismo reactor por espacio de 48 horas, con 8 g de inóculos (4%) y con la adición de carbonato de calcio, de tal manera que se apreciara parte del carbonato de calcio en forma insoluble en todo momento.
- c) Este procedimiento se repitió alternadamente por tres veces.
- d) Al término de cada fermentación, la biomasa (granos de Kefir) fue retirada del medio de cultivo, se lavó con agua por tres veces y se dejó escurrir en un colador con malla N° 35 ASTM, por espacio de 20 minutos. Se tomaron datos del peso húmedo.
- e) Seguidamente, la biomasa fue llevada a la estufa para ser desecada a 60 °C hasta un peso constante. Se tomaron datos de peso seco.

## RESULTADOS

El rendimiento de biomasa del grupo con carbonato de calcio fue mayor que el rendimiento de biomasa del grupo sin carbonato de calcio. Los resultados se pueden ver en la tabla 1 y en el gráfico 1.

Por otro lado, se observó que en el grupo con carbonato de calcio, el pH podía ser controlado en un rango de 3,92 a 4,26 sin dejar que mucho carbonato de calcio permaneciera en exceso, es decir, insoluble; en tanto que en el grupo sin carbonato de calcio, el pH descendió a 3,27.



**Figura 3.** Comparación del incremento de biomasa húmeda y seca, en porcentaje, respecto al control de pH, entre el cultivo control sin carbonato de calcio y el cultivo experimental con carbonato de calcio.

## DISCUSIÓN

Es evidente que al tratar de mantener el pH del medio de cultivo lo más cerca posible al pH óptimo de crecimiento de los granos de Kefir, cuyo valor es 4,4, se logra un efecto significativo del incremento de biomasa, tal como se aprecia en gráfico 1. Si bien el carbonato de calcio no es capaz de sostener un pH muy próximo a 4,4, sí es cierto que impide una fuerte caída del valor de pH, tal como ocurre en los cultivos sin la adición de carbonato de calcio. Por tanto, se puede afirmar que la utilización de carbonato de calcio es una buena alternativa para mantener un pH controlado en las fermentaciones lácticas, considerando que en el presente trabajo de investigación se tomó a la microbiota de los granos de Kefir como representante de muchas bacterias lácticas.

## CONCLUSIONES

a) Se demostró que el carbonato de calcio puede regular un exceso de acidez en una fermentación láctica, lo que a su vez se puede

ver reflejado en un mayor rendimiento de biomasa proveniente de la microbiota de los granos de Kefir, utilizados como agente biológico para este propósito.

b) Se determinó el pH de equilibrio que se establece en el medio de cultivo durante la fermentación, debido a la interacción entre los metabolitos de los granos de Kefir y el carbonato de calcio. El valor de este pH estuvo en un rango comprendido entre 3,92 y 4,26.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brown C. M., Campbell, I., Priest, F. G. *Introducción a la biotecnología*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, 1989. pp. 7-11, 106.
2. Scragg A. *Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. Editorial Limusa S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. Primera edición, Balderas, México, D. F., 1996. pp. 101-123, 190-204, 290-303.
3. Sasaki Tamaki, D. *Elaboración de Kefir*. Tesis para optar el título de ingeniero en industrias alimentarias. Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú, 1995. pp. 32, 33, 34, 38-40.
4. Bourgeois C. M., Larpent, J. P. *Microbiología alimentaria*. Volumen 2. "Fermentaciones alimentarias". Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, 1995. pp. 8-14, 221, 222.
5. Pons Muzzo, G. *Fisicoquímica. Curso básico para las profesiones científicas*. Cuarta edición. Lima, Perú, 1978. pp. 239-243, 385 -392.
6. Chang, R. *Fisicoquímica con aplicaciones a sistemas biológicos*. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V., México. Primera edición en español de la segunda en inglés. México, 1986. pp. 101-107, 387, 388, 475-505.

7. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. et al. (1994). *Bioquímica de Harper*. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. 13ª edición. México, D.F. pp. 73-118.
8. Marshall V. M. y Cole, W. "Studies on Kefir Bull". IDF 179. Dinamarca, 1984.
9. Stecher P. G., Windholz, M., Leahy, D. S. *The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals and Drugs*. Eighth Edition. Published by Merck & Co., Inc. Rahway. N. J. USA, 1968. pp. 604, 855.