



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

**"Evaluación de las propiedades físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de  
kéfir elaborado con leche de almendra (*Prunus dulcis*) y de kéfir elaborado con  
leche de soya (*Glycine max*). "**

Elaborado por  
Carla Belén Yugsi Pinchao

**Director**  
Ing. Rafael Eduardo Vargas Verdesoto, M.Sc.



# INTRODUCCIÓN



## Alimentos y bebidas fermentados

**Presencia de probióticos:**  
Microorganismos vivos que ejercen beneficios sobre el hospedador

### Kéfir

Bebida láctea fermentada

Probiótico natural

Sabor ácido

Consistencia cremosa

Ligera efervescencia

Bajos niveles de alcohol

## Preparación

Cultivo iniciador: **Granos de kéfir**

Leche fresca



Fermentación



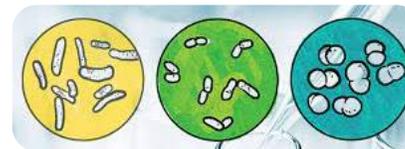
Recuperación de los granos de kéfir

### Granos de kéfir



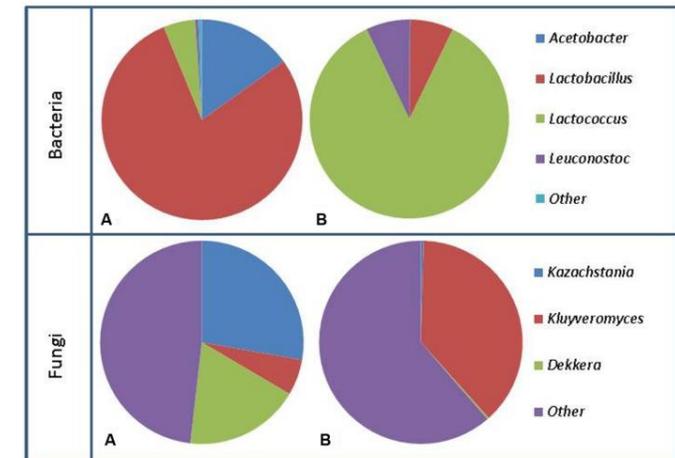
- Masa gelatinosa
- Color blanco o amarillo
- Textura viscosa

Microbiota mixta de BAL, BAA y levaduras  
Coexisten de forma simbiótica

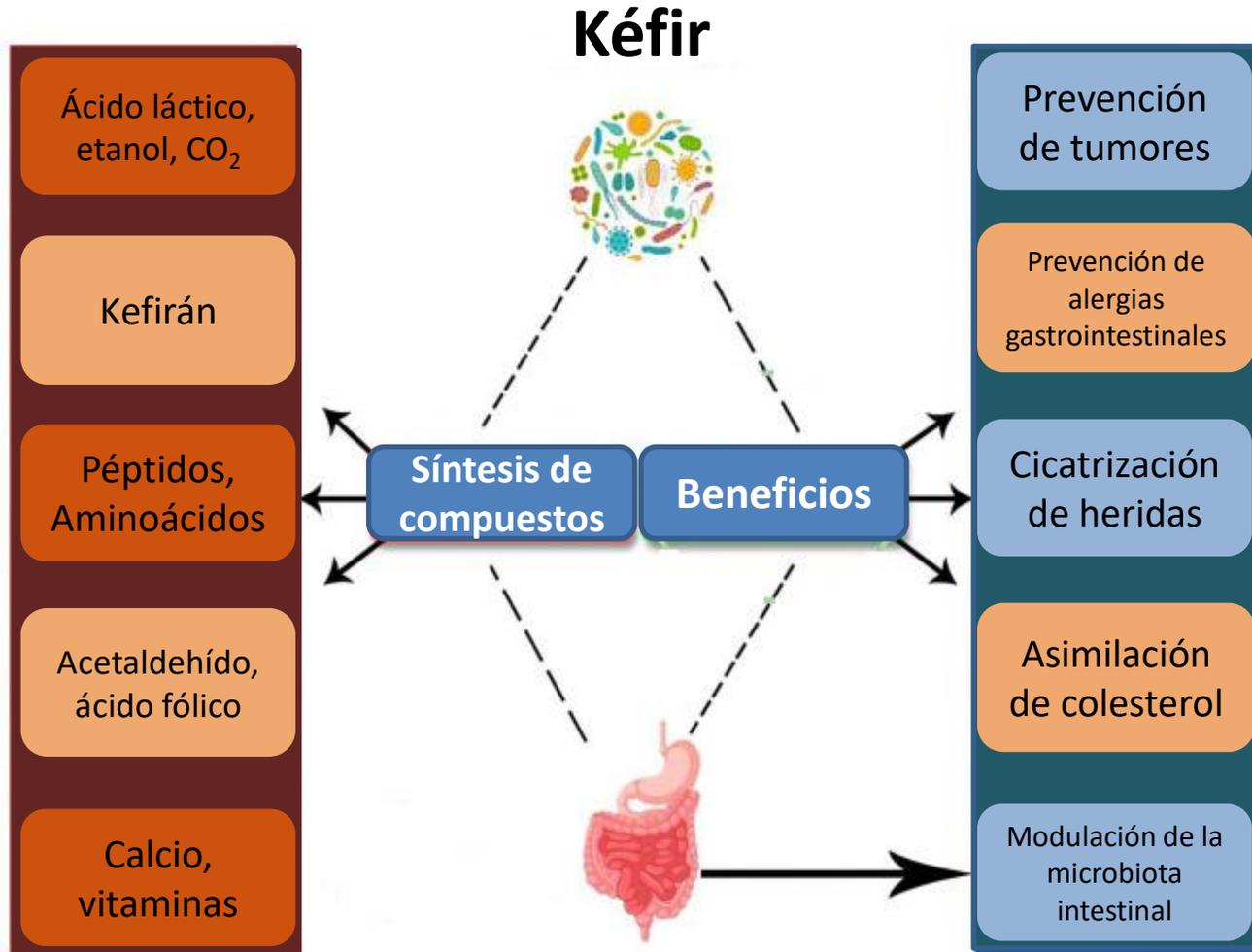


### Distribución de microorganismos

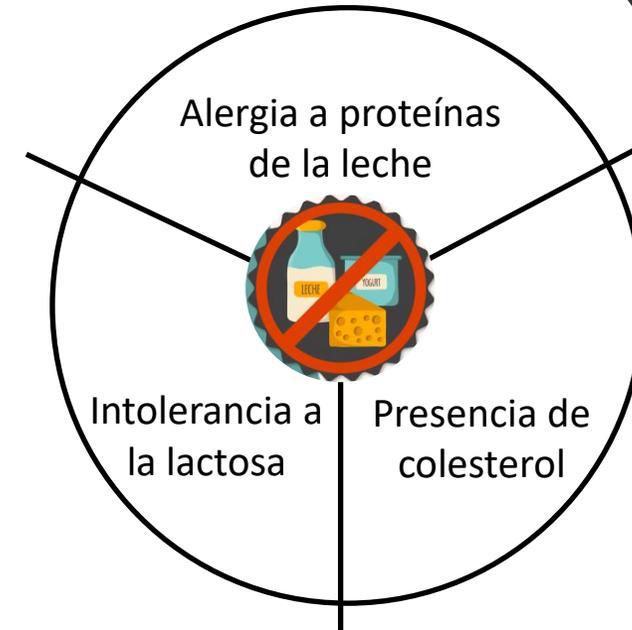
A: Granos de kéfir, B: kéfir



# INTRODUCCIÓN



## Problemas con el consumo de la leche de vaca



### Otros factores:

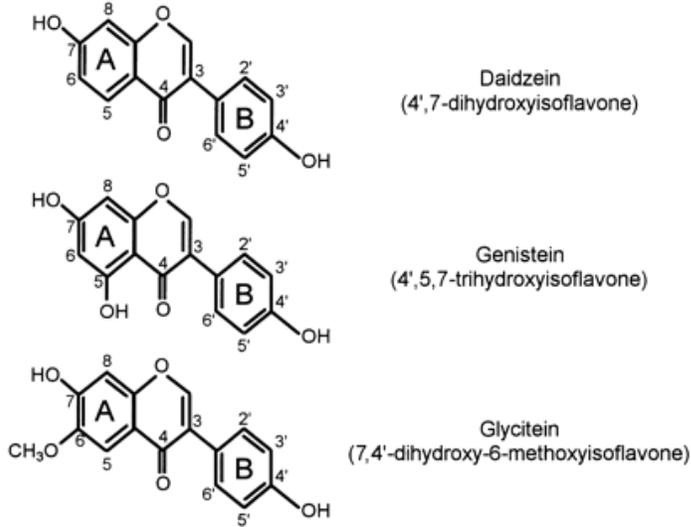
- Consumidores veganos/vegetarianos
- Ética sobre uso de animales
- Problemas ambientales

# INTRODUCCIÓN

## Leche de soya



### Isoflavonas



## Soya (*Glycine max*)

> 60%

Consumo de proteínas y aceites vegetales

### Alto contenido de:

- Proteínas
- Fibras
- Fitoesteroles
- Isoflavonas

Prebióticos

## Leche de almendra

Suspensión coloidal



## Almendra (*Prunus dulcis*)

### Presencia de:

- Ácidos grasos poliinsaturados
- Fibra
- Vitaminas
- Minerales
- Fitoesteroles y polifenoles

## Leches vegetales

Ideal para la elaboración de kéfir



### Factores que influyen en el proceso de fermentación

Tiempo  
Temperatura

Sustrato  
Relación inóculo/leche

Distribución de microorganismos

## Objetivo General

Evaluar las propiedades físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de kéfir elaborado con leche de almendra (*Prunus dulcis*) y de kéfir elaborado con leche de soya (*Glycine max*).

## Objetivos Específicos

- Elaborar kéfir de leche de almendra y kéfir de leche de soya a partir de un inóculo comercial, y dejar fermentar por 18, 24 y 48 horas.
- Determinar el aspecto, color, olor, pH, densidad, azúcar total y contenido de ácido láctico del kéfir de leche de almendra y del kéfir de leche de soya.
- Comparar las propiedades microbiológicas del kéfir de leche de almendra y del kéfir de leche de soya, con las establecidas en la norma NTE INEN 2395 para leches fermentadas.
- Evaluar propiedades sensoriales del kéfir de leche de almendra y del kéfir de leche de soya por medio de una encuesta a un grupo de evaluadores no experimentados mayores de 18 años.



# METODOLOGÍA

## Granos de kéfir



Tienda "Artesanías del Mundo"

## Pesaje



## Leches vegetales



## Recipiente de vidrio estéril



2 L

Adición de sacarosa: 2g/100mL

## Leche vegetal



1 500 mL

10% (p/v)

## Granos de kéfir



150 g

## Preparación del kéfir

### Tiempo de fermentación

18 horas

24 horas

48 horas

### Toma de muestras para el análisis físico-químico, microbiológico y sensorial



Kéfir de leche de soya



Kéfir de leche de almendra

# METODOLOGÍA

## Análisis Físico-químico



**Aspecto, Color, Olor**  
Percepción de los sentidos



**pH**  
Potenciómetro digital  
(selpHbalance)



**Azúcar Total**  
Refractómetro de Abbe  
(%)



**Densidad**  
Método gravimétrico – Pícnometro  
de 25 mL

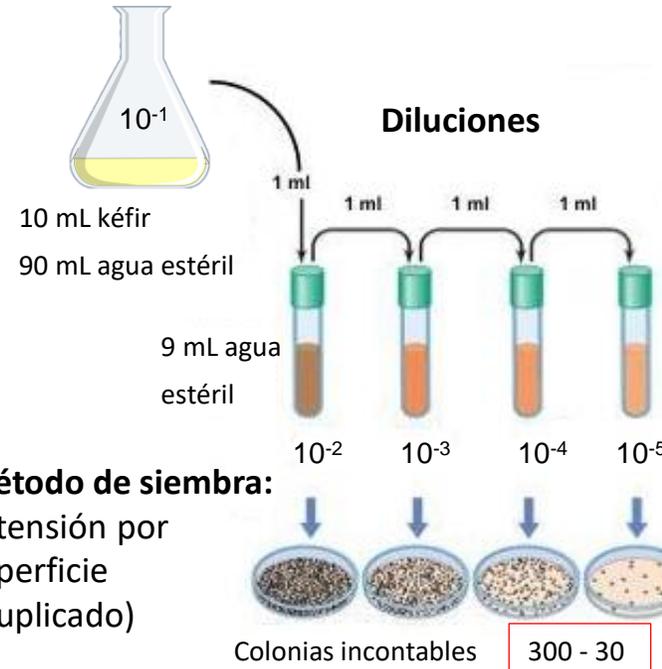


**Contenido de ácido láctico**  
Acidez titulable, NaOH 0,1 N  
(mg/100 mL)

## Análisis Microbiológico



### Recuento microbiano



### Tinción Gram



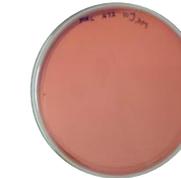
### Medios Utilizados



**MRS (Man-Rogosa-Sharpe)**  
Recuento de bacterias ácido lácticas



**PDA (Agar Dextrosa y Papa)**  
Recuento de hongos y levaduras



**MKL (Agar MacConkey)** Control de calidad de Coliformes totales



# METODOLOGÍA

## Evaluación Sensorial

### Prueba hedónica afectiva

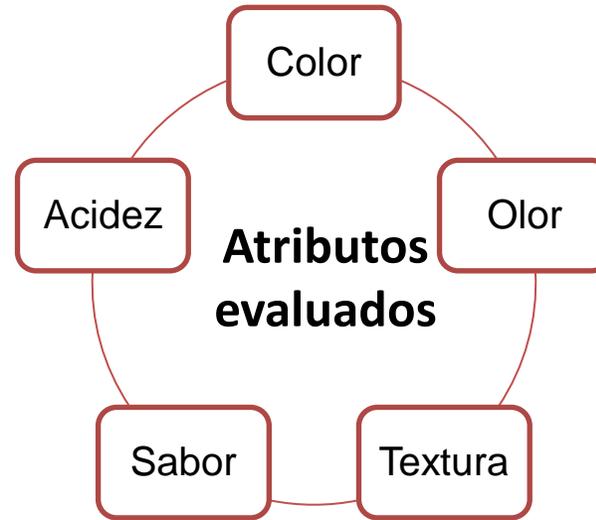
- 20 evaluadores no experimentados
- Mayores de 18 años

Muestras



### Escala hedónica

Puntaje	Escala de medición
5	Me gusta mucho
4	Me gusta moderadamente
3	No me gusta ni me disgusta
2	Me disgusta moderadamente
1	Me disgusta mucho



Evaluación de las características sensoriales de kéfir elaborado con leche de soya y kéfir elaborado con leche de almendra

Tiempo de fermentación: 18 horas

Evaluación del kéfir de leche de almendra

	Color	Olor	Textura	Sabor	Acidez
Me gusta mucho	<input type="checkbox"/>				
Me gusta mode...	<input type="checkbox"/>				
No me gusta ni ...	<input type="checkbox"/>				
Me disgusta m...	<input type="checkbox"/>				
Me disgusta m...	<input type="checkbox"/>				

## Análisis Estadístico



### Análisis Físico-químico

Toma de datos: 5 Réplicas  
Análisis de varianza  
Prueba de Duncan al 0.05 de significancia

### Análisis sensorial

Análisis de varianza

Prueba Duncan al 0.05 de significancia

Prueba de independencia de Chi-cuadrado Pearson



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Análisis Físico-químico

### Aspecto, color, olor

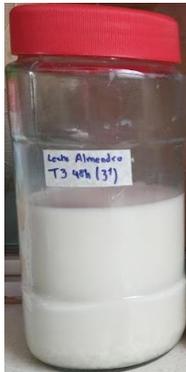
Leche de soya



Kéfir de leche de soya



Leche de almendra



Kéfir de leche de almendra



Tabla 1

Descripción del aspecto, color y olor del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra fermentado a 18, 24 y 48 horas

	Aspecto	Color	Olor
<b>Kéfir de leche de soya</b>	Líquido cremoso, homogéneo y libre de grumos	Blanquecino	Característico de la soya fermentada
<b>Kéfir de leche de almendra</b>	Sustancia coloidal, con separación de fases	Sedimento: Blanquecino Sobrenadante: Ligeramente blanquecino	Característico de bebida acidificada

Cambios en el aspecto, color y olor → Fermentación del medio

### Principales azúcares

Leche de soya  
(Dadkhaha *et al.*, 2011)

- Sacarosa
- Rafinosa
- Estaquinosa

Leche de almendra  
(Barreca *et al.*, 2020)

- Sacarosa
- Rafinosa
- Glucosa

Proporción de grano/leche

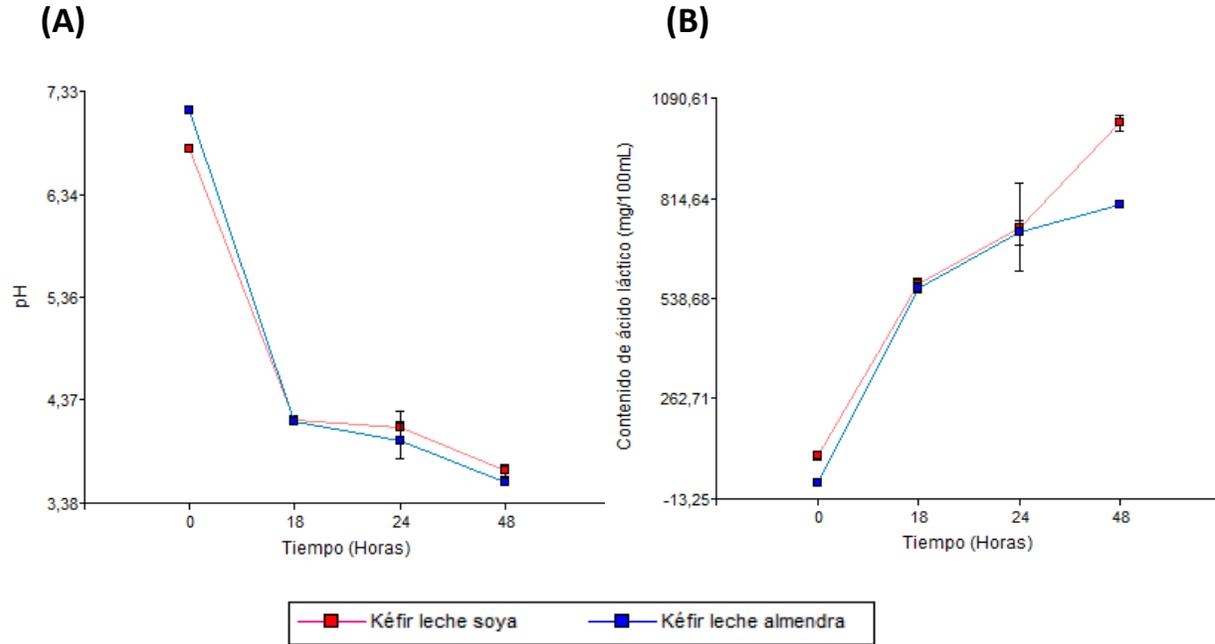


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Análisis Físico-químico pH y Contenido de ácido láctico

Figura 1

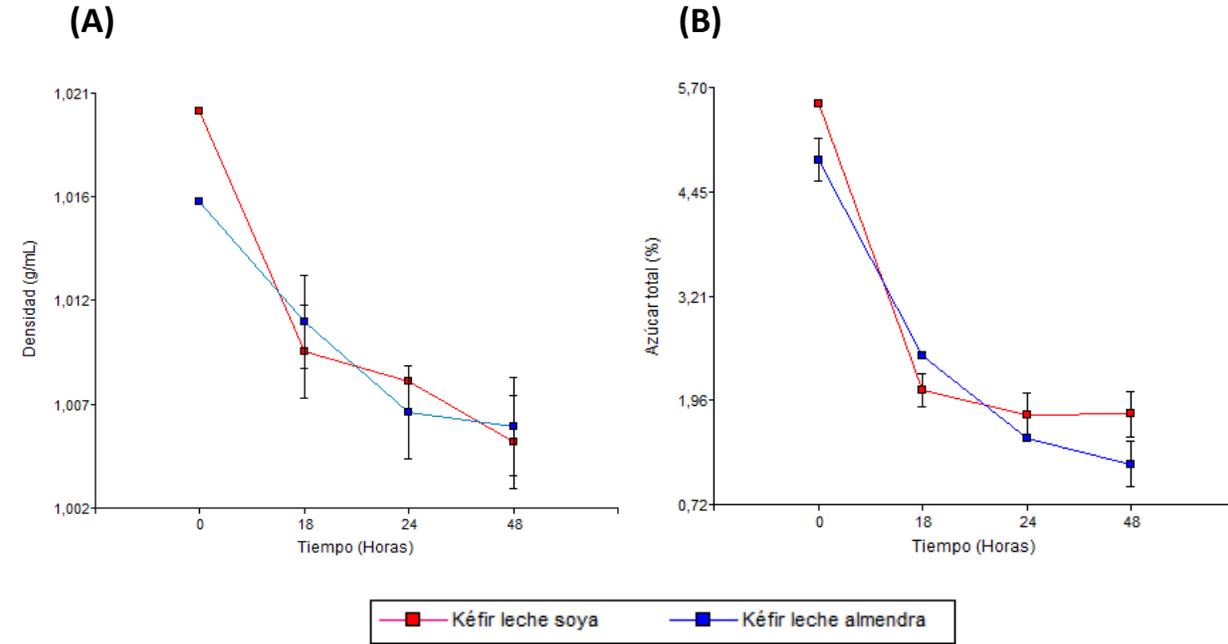
Comportamiento del pH y contenido de ácido de láctico en el kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra a las 0h, 18h, 24h y 48h de fermentación. (A) pH. (B) Contenido de ácido láctico.



## Densidad y azúcar total

Figura 2

Comportamiento de la densidad y azúcar total en el kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra a las 0h, 18h, 24h y 48h de fermentación. (A) Densidad y (B) Azúcar total.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 2**

*Características físico-químicas de las muestras del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra.*

Parámetro	Leche de soya sin fermentar	Kéfir de leche de soya			Leche de almendra sin fermentar	Kéfir de leche de almendra		
		Tiempo de fermentación				Tiempo de fermentación		
		18 h	24 h	48 h		18 h	24 h	48 h
pH	6.78 <sup>a</sup>	4.19 <sup>b</sup>	4.17 <sup>b</sup>	3.71 <sup>c</sup>	7.15 <sup>a</sup>	4.17 <sup>b</sup>	4.05 <sup>c</sup>	3.58 <sup>d</sup>
Densidad (g/mL)	1.02 <sup>a</sup>	1.009 <sup>b</sup>	1.008 <sup>b</sup>	1.005 <sup>c</sup>	1.016 <sup>a</sup>	1.011 <sup>b</sup>	1.007 <sup>c</sup>	1.006 <sup>c</sup>
Azúcar total (%)	5.5 <sup>a</sup>	2.08 <sup>b</sup>	1.83 <sup>b,c</sup>	1.75 <sup>c</sup>	4.83 <sup>a</sup>	2.5 <sup>b</sup>	1.5 <sup>c</sup>	1.25 <sup>d</sup>
Contenido de ácido láctico (mg/100mL)	106.62 <sup>a</sup>	578.14 <sup>b</sup>	689.27 <sup>c</sup>	1019.63 <sup>d</sup>	30.03 <sup>a</sup>	567.63 <sup>b</sup>	707.29 <sup>c</sup>	795.13 <sup>d</sup>

*Nota.* Los valores en la misma fila mostrados con letras iguales no son significativamente diferentes (valor-p > 0,05), tanto para el kéfir de leche de soya como el kéfir de leche de almendra.

## Kéfir de leche de soya

24 h Gamba *et al.* (2020):

- pH: 4.40 ± 0.05
- Contenido de ácido láctico: 697.7 ± 15.6 mg/100 mL
- Azúcar total: 0.87%

## Kéfir de leche de almendra

Cultivo de BAL al 1% (v/v), 24 h

- pH: 4,7 (Wansutha *et al.*, 2018) y 4.65 (Bernat *et al.*, 2015)

## Kéfir de leche de vaca: (Baú *et al.*, 2015)

- pH: 4 – 5
- Contenido de ácido láctico: max 1g/100 mL

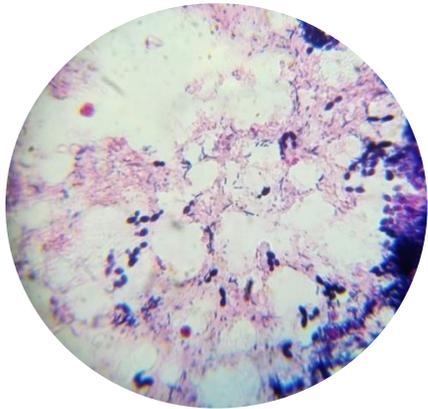


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

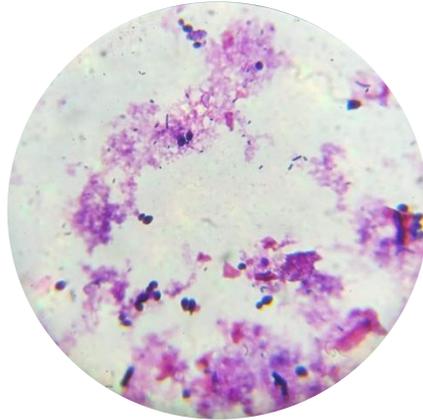
## Análisis Microbiológico

### Tinción Gram

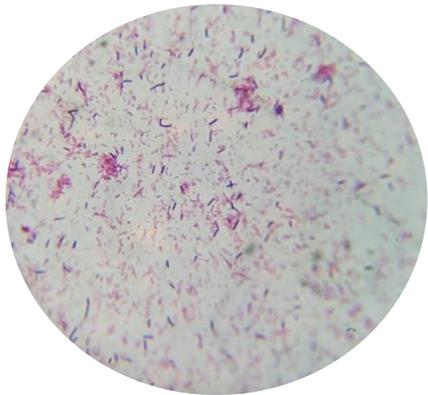
Kéfir L. A: 24 h 100X



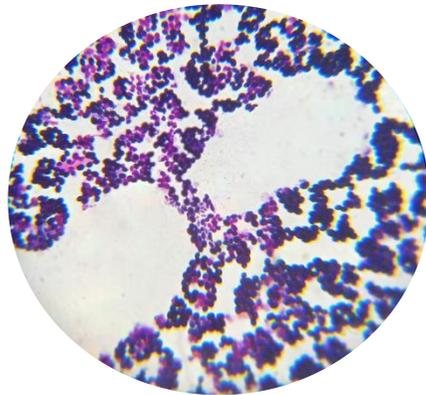
Kéfir L. S: 24 h 100X



Colonia medio MRS 100X



Colonia medio PDA 100X



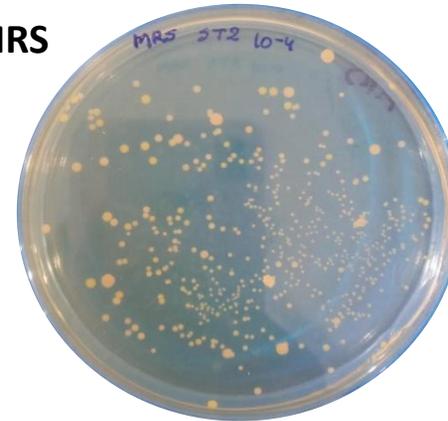
Presencia de: *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*

Tabla 3

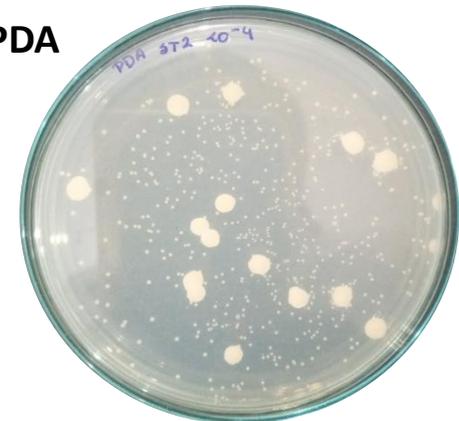
Caracterización microscópica y macroscópica de las muestras de kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra.

Identificación microscópica de las muestras de kéfir		Morfología de colonias	Identificación microscópica		Morfología de colonias	Identificación microscópica	
Microorganismos observados	Tinción Gram	Medio MRS	Microorganismos observados	Tinción Gram	Medio PDA	Microorganismos observados	Tinción
Bacilos	Gram <sup>+</sup>	Colonias blancas y amarillas, lisas, circulares de margen entero	Bacilos largos y cortos	Gram <sup>+</sup>	Colonias blancas circulares, cremosas y de borde entero	Levaduras ovoides y circulares	Moradas
Cocobacilos	Gram <sup>+</sup>		Cocobalicos	Gram <sup>+</sup>			
Cocos	Gram <sup>+</sup>	Bacilos largos	Gram <sup>+</sup>				
Levaduras	Moradas	Colonias blanquecinas rugosas e irregulares	Cocos	Gram <sup>+</sup>			

MRS



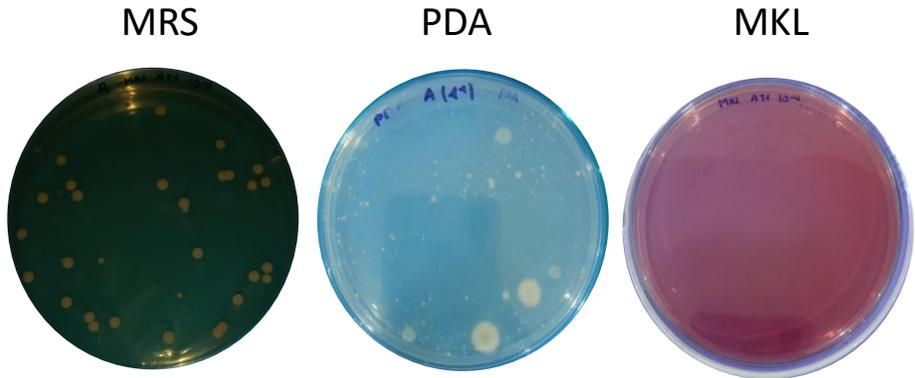
PDA



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Análisis Microbiológico Recuento microbiano



FAO (2002): Alimento considerado probiótico

- $> 10^6 - 10^8$  UFC/g
- $> 10^8 - 10^{10}$  UFC/dosis de células viables

Łopusiewicz *et al.*, 2020:

Alta capacidad de supervivencia de la microflora del kéfir en bebidas de origen vegetal ✓

**Tabla 4**

*Criterios de calidad del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra para el cumplimiento de los requisitos microbiológicos establecidos por la norma ecuatoriana NTE INEN 2395 para leches fermentadas.*

**Cantidad de microorganismos específicos en la leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación**

Parámetro	Requisito mínimo	Recuentos viables del kéfir de leche de soya (UFC/mL)				Recuentos viables del kéfir de leche de almendra (UFC/mL)			
		18 h	24 h	48 h		18 h	24 h	48 h	
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido para cada producto	$10^7$ UFC/g	$2,83 \times 10^7$	$1,15 \times 10^8$	$1,63 \times 10^8$	Cumple	$4,61 \times 10^7$	$3,12 \times 10^7$	$6,02 \times 10^7$	Cumple
Bacterias probióticas	$10^6$ UFC/g	$1,57 \times 10^7$	$4,90 \times 10^7$	$7,60 \times 10^7$	Cumple	$3,01 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$	$3,60 \times 10^7$	Cumple
Levaduras	$10^4$ UFC/g	$1,26 \times 10^7$	$6,60 \times 10^7$	$8,70 \times 10^7$	Cumple	$1,60 \times 10^7$	$1,32 \times 10^7$	$2,42 \times 10^7$	Cumple

**Requisitos microbiológicos en la leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación**

Parámetro	Requisito		Recuentos viables del kéfir de leche de soya (UFC/mL)				Recuentos viables del kéfir de leche de almendra (UFC/mL)			
	m	M	18 h	24 h	48 h		18 h	24 h	48 h	
Coliformes totales (UFC/g)	10	100	0	0	0	Cumple	0	0	0	Cumple

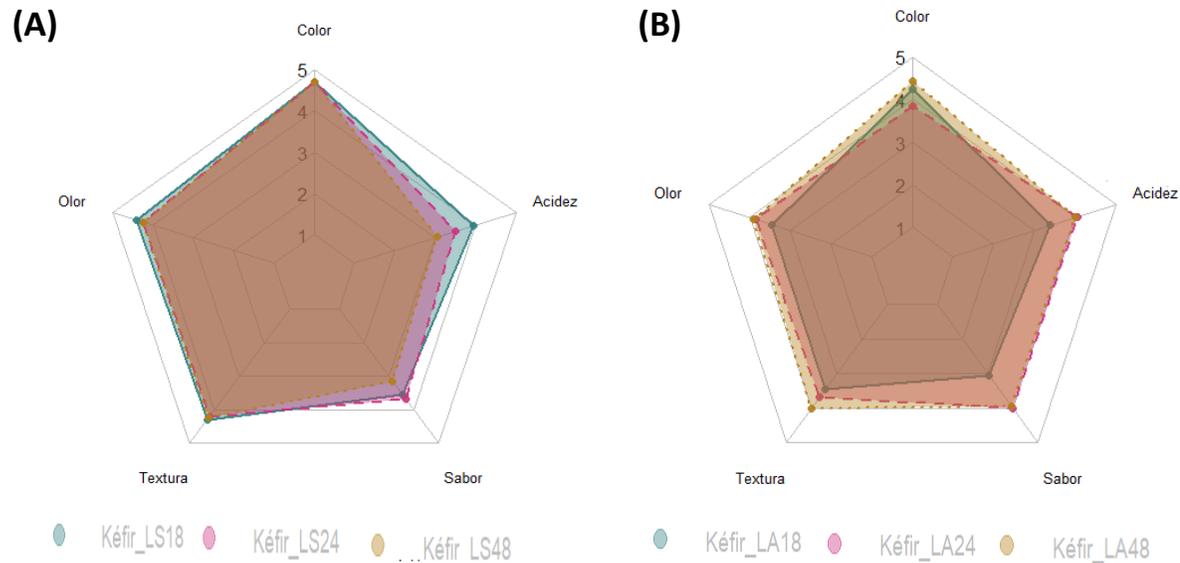


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Análisis Sensorial

**Figura 3**

Diagrama de araña de la evaluación de los atributos sensoriales del **(A)** kéfir de leche de soya y **(B)** kéfir de leche de almendra, fermentados a 18 h, 24 h y 48 h.



**Tabla 5**

Puntuaciones medias de los atributos sensoriales evaluados.

Atributos	Kéfir de leche de soya			Kéfir de leche de almendra		
	18 h	24 h	48 h	18 h	24 h	48 h
Color	4.7 <sup>a</sup>	4.7 <sup>a</sup>	4.7 <sup>a</sup>	4.25 <sup>a, b</sup>	3.85 <sup>a</sup>	4.45 <sup>b</sup>
Olor	4.4 <sup>a</sup>	4.25 <sup>a</sup>	4.25 <sup>a</sup>	3.45 <sup>a</sup>	3.85 <sup>a</sup>	3.9 <sup>a</sup>
Textura	4.3 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>	4.25 <sup>a</sup>	3.45 <sup>a</sup>	3.7 <sup>a</sup>	4.0 <sup>a</sup>
Sabor	3.55 <sup>a</sup>	3.7 <sup>a</sup>	3.15 <sup>a</sup>	3.05 <sup>a</sup>	4.0 <sup>b</sup>	3.95 <sup>b</sup>
Acidez	3.95 <sup>a</sup>	3.5 <sup>a, b</sup>	3.05 <sup>b</sup>	3.4 <sup>a</sup>	4.05 <sup>a</sup>	4.0 <sup>a</sup>
<b>Media</b>	<b>4.18<sup>a</sup></b>	<b>4.07<sup>a</sup></b>	<b>3.88<sup>a</sup></b>	<b>3.52<sup>a</sup></b>	<b>3.89<sup>a, b</sup></b>	<b>4.06<sup>b</sup></b>

Ácido láctico y etanol

Alteración organoléptica

Acetaldehído y diacetilo

Aroma

Polisacáridos

Textura y cremosidad

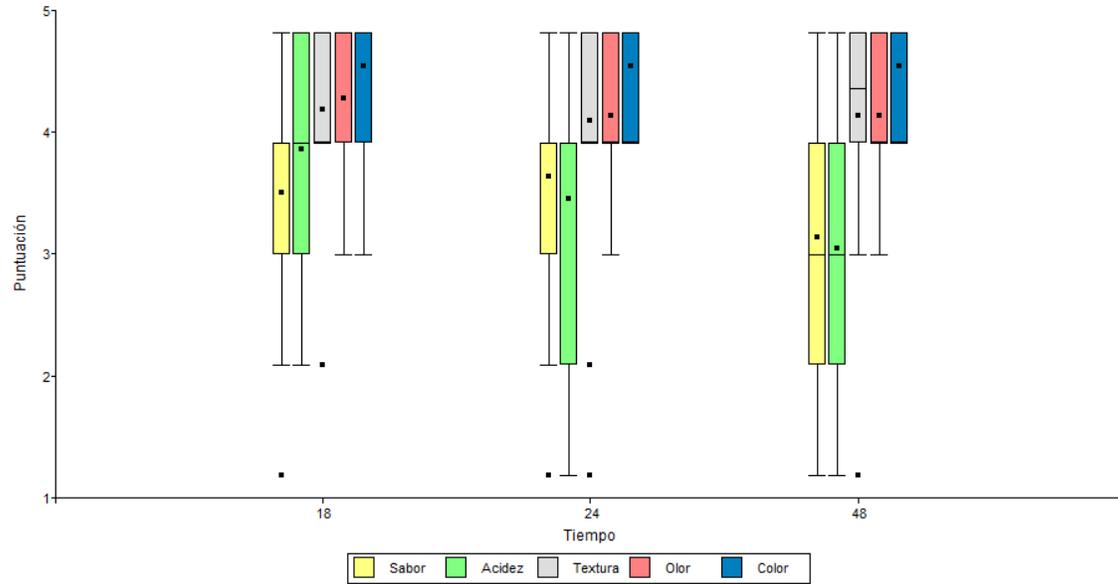
(Santos & Vega, 2012)



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Figura 4**

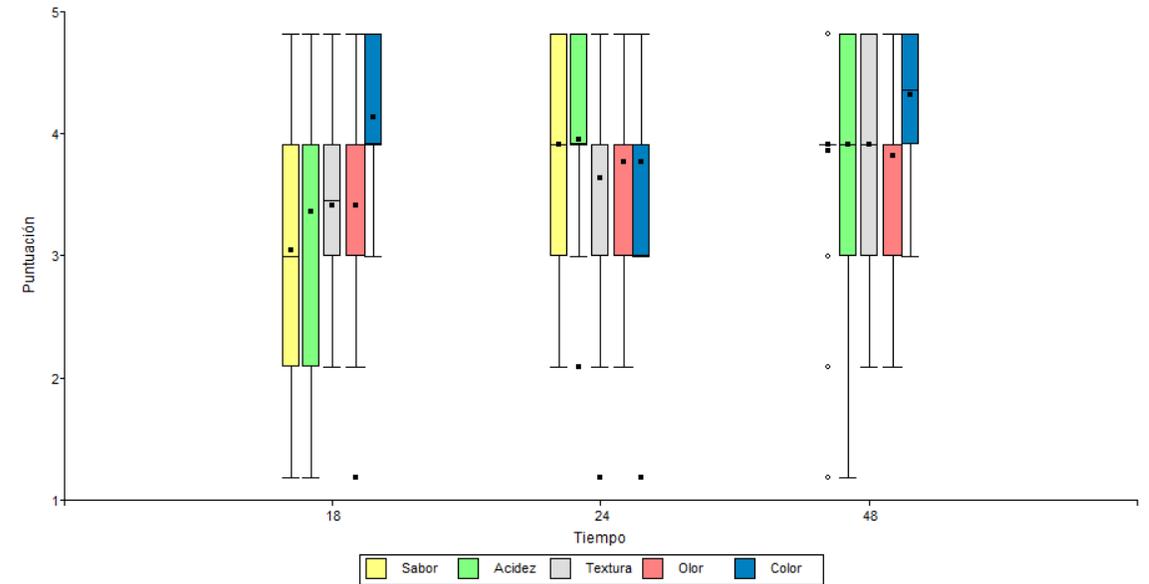
Diagrama de cajas para las puntuaciones de los atributos sensoriales del kéfir de leche de soya a las 18h, 24h y 48h.



Puntuaciones más homogéneas:  
Kéfir de leche de soya fermentado hasta las **18 horas**

**Figura 5**

Diagrama de cajas para las puntuaciones de los atributos sensoriales del kéfir de leche de almendra a las 18h, 24h y 48h.



Puntuaciones más homogéneas:  
Kéfir de leche de almendra fermentado hasta las **48 horas**



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Prueba de independencia

$H_0$ : Las puntuaciones de los atributos sensoriales son independientes del tiempo de fermentación.

$H_1$ : Las puntuaciones de los atributos sensoriales son dependientes del tiempo de fermentación.

**Tabla 6**

*Prueba de independencia de Chi-cuadrado Pearson de los atributos sensoriales evaluados para el kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra.*

Atributo	Kéfir de leche de soya			Kéfir de leche de almendra		
	Chi-cuadrado Pearson	Valor-P	Conclusión	Chi-cuadrado Pearson	Valor-P	Conclusión
Color	0.00	>0.999	Se acepta $H_0$	0.89	0.6400	Se acepta $H_0$
Olor	0.07	0.9657	Se acepta $H_0$	0.65	0.7219	Se acepta $H_0$
Textura	0.02	0.9883	Se acepta $H_0$	0.82	0.6649	Se acepta $H_0$
Sabor	0.93	0.6273	Se acepta $H_0$	3.12	0.2103	Se acepta $H_0$
Acidez	2.31	0.3144	Se acepta $H_0$	1.37	0.5038	Se acepta $H_0$



Valor -  $p > 0.05$

No hay relación entre el tiempo de fermentación y los atributos sensoriales



Tangyu *et al.* (2019): Mejora del perfil sensorial de las bebidas de origen vegetal por la fermentación



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Intervalos de confianza

Aceptabilidad general del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra

### Intervalos de confianza

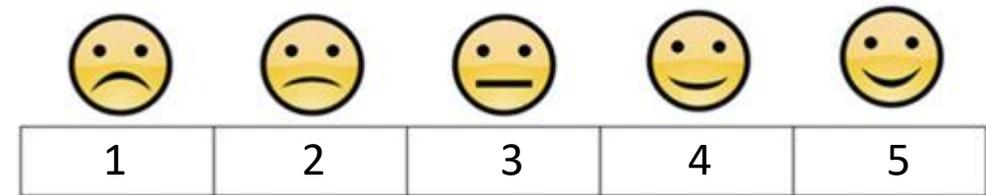
Bilateral  
Estimación paramétrica

Tipo de kéfir	Variable	Parámetro	Estimación	E.E.	n	LI (95%)	LS (95%)
K_Almendra	Dato	Media	3,82	0,09	15	3,62	4,02
K Soya	Dato	Media	4,04	0,14	15	3,74	4,34

Aceptación media sin rechazo extremo ✓



Nivel de aceptación para el kéfir de leche de soya y kéfir de leche de almendra según la escala hedónica



Puntaje	Escala de medición
5	Me gusta mucho
4	Me gusta moderadamente
3	No me gusta ni me disgusta
2	Me disgusta moderadamente
1	Me disgusta mucho



# CONCLUSIONES

- La fermentación con granos de kéfir en la leche de soya y en la leche de almendra fermentadas a las 18, 24 y 48 horas, cambio la apariencia, color y olor de las leches vegetales como resultado de un aumento del contenido de ácido láctico y una disminución del pH, azúcar total y densidad.
- Tanto en el kéfir de leche de soya como en el kéfir de leche de almendra se identificó la presencia de bacterias ácido lácticas y levaduras que generaron recuentos de al menos  $10^7$  UFC/mL y que cumplen con los criterios de calidad establecidos por la norma ecuatoriana NTE INEN 2395 para leches fermentada, por lo que fueron aptas para el consumo humano.
- El análisis de las propiedades sensoriales indicó que, para el kéfir de leche de soya no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las puntuaciones generales medias de los atributos evaluados a las 18, 24 y 48 horas de fermentación, por otro lado se determinó que el kéfir de leche de almendra fermentado hasta las 48 horas fue el más aceptado por parte de los evaluadores, con una puntuación general media de 4.06 en una escala hedónica de 5 puntos.
- La Prueba de independencia de Chi-cuadrado Pearson indicó que las puntuaciones de los atributos fueron independientes del tiempo de fermentación, además se determinó que la aceptabilidad general del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra se encontró entre (3.74 - 4.34) y (3.62 – 4.02) respectivamente, lo que se traduce según la escala hedónica de 5 puntos como una aceptación media sin rechazo extremo.



# RECOMENDACIONES

- Realizar una comparación entre el comportamiento de los parámetros físico-químicos, microbiológicos y sensoriales de las bebidas vegetales y la variación de la concentración de inóculo/granos de kéfir a añadir.
- Emplear el uso de leches vegetales caseras o realizadas de forma tradicional para la elaboración del kéfir.
- Analizar otros parámetros químicos como el contenido de otros ácidos orgánicos, azúcares y el contenido proteico del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra.
- Utilizar medios diferenciales para el recuento de bacterias ácido acéticas.
- Realizar pruebas inhibitorias de bacterias patógenas para determinar si el kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra tienen efectos antibacterianos.
- Seleccionar un número más amplio de evaluadores para el análisis sensorial.



# AGRADECIMIENTOS



**Ing. Rafael Vargas, M.Sc.**  
Director del Proyecto de Investigación  
Carrera de Ingeniería en Biotecnología  
ESPE

**Karina Ponce, M. Sc.**  
Directora de la Carrera de Ingeniería en  
Biotecnología ESPE



**Fernanda Loayza Villa, Ph. D.**  
Universidad San Francisco de Quito

**Pedro Romero Saker M. Sc.**  
Biometrista

**Familia**

**Amigos y Compañeros**

