



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*)

Yugsi Pinchao, Carla Belén

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

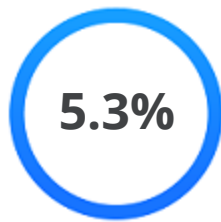
Trabajo de Integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

M. Sc. Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

22 de febrero del 2022

Yugsi_UIC Copyleaks.docx

Scanned on: 14:54 April 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	169
Words with Minor Changes	11
Paraphrased Words	534
Omitted Words	0



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“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*)”** fue realizado por la señorita **Yugsi Pinchao, Carla Belén**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022



firmado electrónicamente por:
RAFAEL EDUARDO
VARGAS VERDESOTO

Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

C. C. 1708200538



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Yugsi Pinchao Carla Belén**, con cédula de ciudadanía n° 172635562-9, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“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*)”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022

Firma

Yugsi Pinchao Carla Belén

C.C.: 1726355629



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Yugsi Pinchao Carla Belén**, con cédula de ciudadanía n°172635562-9, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“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*)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022

Firma

.....
Yugsi Pinchao Carla Belén

C.C.: 1726355629

Dedicatoria

A mis padres Erika y Walter.

Mis hermanos Mateo y David.

Mis abuelos Luis, Olimpia y Betty.

Por siempre confiar en mí y darme todo el ánimo y la motivación necesaria para culminar la etapa universitaria.

Carla Belén Yugsi Pinchao

Agradecimiento

A Dios, por darme salud, vida y la dicha de compartir todos los buenos momentos con mis seres más queridos.

A mis padres Erika y Walter, por su apoyo y amor incondicional a lo largo de toda mi vida y por enseñarme a ser una persona perseverante.

A mis hermanos, por su apoyo, cariño y consejos.

A mis abuelos Luis, Olimpia y Betty, por ser una motivación para continuar firmemente con mis estudios.

A mi tía Angélica y mis padrinos Cristian y Tanya, por su apoyo y cariño.

A Rafael Vargas, Karina Ponce y Fernanda Loayza por ser sabios profesores, brindarnos los conocimientos necesarios y su apoyo constante para el desarrollo del presente proyecto.

A mis amigos y compañeros que hicieron de la universidad una etapa inolvidable.

Carla Belén Yugsi Pinchao

Índice de Contenido

Reporte Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de Contenido.....	8
índice de Tablas	11
índice de Figuras	12
Resumen.....	13
Abstract	14
Capítulo I. Introducción	15
Antecedentes.....	15
Formulación del problema.....	16
Justificación	17
<i>Objetivo General</i>	<i>20</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>20</i>
Hipótesis.....	20
Capítulo II. Marco Teórico.....	21
Leches de origen vegetal	21
<i>Leche de soya</i>	<i>22</i>
<i>Leche de almendra.....</i>	<i>24</i>
Productos lácteos fermentados	25
Kéfir de leche de vaca.....	26
<i>Origen.....</i>	<i>26</i>
<i>Características.....</i>	<i>26</i>
<i>Composición química</i>	<i>27</i>
<i>Granos de kéfir</i>	<i>27</i>
<i>Composición microbiana de los granos de kéfir y del kéfir.....</i>	<i>28</i>
<i>Preparación.....</i>	<i>30</i>
<i>Actividad biológica</i>	<i>31</i>

Productos no lácteos fermentados con granos de kéfir	32
Evaluación sensorial	33
Capítulo III. Materiales y Métodos	35
Granos de kéfir y activación	35
Toma de muestras de leches vegetales	35
Inoculación de los granos de kéfir	35
Toma de muestras para el análisis físico-químico, microbiológico y sensorial	36
Determinación del aspecto, color y olor	36
Determinación de las propiedades físico-químicas del kéfir de leche de soya, kéfir de leche de almendra y las leches sin fermentar	36
<i>pH</i>	<i>36</i>
<i>Densidad</i>	<i>36</i>
<i>Azúcar total</i>	<i>37</i>
<i>Acidez titulable</i>	<i>37</i>
Análisis microbiológico	38
<i>Tinción Gram</i>	<i>38</i>
<i>Recuento microbiano</i>	<i>39</i>
Evaluación de las propiedades sensoriales	40
<i>Evaluadores</i>	<i>40</i>
<i>Atributos sensoriales</i>	<i>40</i>
Análisis estadístico	41
Capítulo IV. Resultados	42
Análisis físico-químico	42
<i>Apariencia, color, olor</i>	<i>42</i>
<i>pH y contenido de ácido láctico</i>	<i>42</i>
<i>Densidad y azúcar total</i>	<i>43</i>
Análisis microbiológico	46
Evaluación sensorial	48
Capítulo V. Discusión	55
Capítulo VI. Conclusiones	59
Capítulo VII. Recomendaciones	60
Capítulo VIII. Bibliografía	61

Capítulo IX. Apéndices 67

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición general de la soya y la leche de soya	24
Tabla 2. Composición general de la almendra y la leche de almendra	25
Tabla 3. Escala hedónica para la evaluación de los atributos sensoriales	40
Tabla 4. 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	42
Tabla 5. Características físico-químicas de las muestras del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra	45
Tabla 6. Caracterización microscópica y macroscópica de las muestras de kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra	46
Tabla 7. Recuentos viables para el kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra	47
Tabla 8. 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	48
Tabla 9. Puntuaciones medias de los atributos sensoriales evaluados	51
Tabla 10. Prueba de independencia de Chi-cuadrado de los atributos sensoriales evaluados para el kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra	54

Índice de Figuras

Figura 1. Estructuras de las isoflavonas primarias de la soya	23
Figura 2. Estructura del kefir.....	28
Figura 3. Representación de los cambios en la población bacteriana y de hongos	30
Figura 4. 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.....	43
Figura 5. 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	44
Figura 6. Diagrama de cajas para la evaluación de los atributos (A) acidez y (B) color, del kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra fermentado a las 18h, 24h y 48h	49
Figura 7. 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 18h, 24h y 48h	50
Figura 8. Diagrama de cajas para las puntuaciones de los atributos sensoriales del kéfir de leche de soya fermentado a las 18h, 24h y 48h	52
Figura 9. Diagrama de cajas para las puntuaciones de los atributos sensoriales del kéfir de leche de almendra fermentado a las 18h, 24h y 48h	53

Resumen

El kéfir es un producto lácteo fermentado que poco a poco ha aumentado su popularidad por la serie de beneficios que se asocian a su consumo y por ser considerado una bebida probiótica natural, sin embargo debido a problemas asociados al consumo de leche de vaca tales como la intolerancia a la lactosa, alergias a las proteínas de la leche, alto contenido de colesterol e incluso por el aumento de personas veganos/vegetarianos se ha buscado implementar los beneficios del kéfir en otras bebidas o sustratos de origen no lácteos que se asemejen a la leche bovina. En este estudio se utilizó leche de soya y leche de almendra para la elaboración de kéfir fermentado a 18, 24 y 48 horas y su posterior análisis físico-químico, microbiológico y sensorial. La fermentación a los distintos tiempos para ambas leches vegetales dio como resultado cambios en el aspecto, color y olor de ambas bebidas, además se dio un aumento en el contenido de ácido láctico y una disminución del pH, azúcar total y densidad del medio. Se obtuvieron recuentos de al menos 10^7 UFC/mL de bacterias ácido lácticas y levaduras para ambos casos, cumpliendo con los parámetros establecidos por la norma ecuatoriana NTE INEN 2395 para leches fermentadas. Finalmente, el análisis sensorial indicó que la aceptabilidad general media 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.

Palabras clave: Probióticos, kéfir, granos de kéfir, leche vegetal.

Abstract

Kefir is a fermented milk product that has gradually increased its popularity due to the series of benefits associated with its consumption and for being considered a natural probiotic drink, however due to problems associated with the consumption of cow's milk such as lactose intolerance, allergies to milk proteins, high cholesterol content and even due to the increase of vegans/vegetarians, it has been sought to implement the benefits of kefir in other drinks or substrates of non-dairy origin, allergies to milk proteins, high cholesterol content and even due to the increase of vegans/vegetarians, it has been sought to implement the benefits of kefir in other beverages or substrates of non-dairy origin that are similar to bovine milk. In this study, soy milk and almond milk were used for the preparation of kefir fermented at 18, 24 and 48 hours and its subsequent physicochemical, microbiological and sensory analysis. Fermentation at different times for both vegetable milks resulted in changes in the appearance, color and odor of both beverages, as well as an increase in lactic acid content and a decrease in pH, total sugar and density of the medium. Counts of at least 10^7 CFU/mL of lactic acid bacteria and yeasts were obtained for both cases, complying with this and other parameters established by Ecuadorian standard NTE INEN 2395 for fermented milks. Finally, the sensory analysis revealed that the average overall acceptability of soy milk kefir and almond milk kefir was between (3.74 - 4.34) and (3.62 - 4.02) respectively, which translates according to the 5-point hedonic scale as an average acceptability without extreme rejection.

Key words: Probiotics, kefir, kefir grains, vegetable milk.

Capítulo I. Introducción

Antecedentes

El kéfir es una bebida láctea fermentada originaria de los Balcanes, Europa del Este y el Cáucaso (Prado et al., 2015) que se ha consumido desde la antigüedad por los altos beneficios que presenta para la salud, su preparación se realiza de forma tradicional por medio de un cultivo iniciador compuesto por una microbiota mixta de diferentes bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA) y levaduras, que coexisten e interactúan de forma simbiótica en una matriz inerte de polisacáridos y proteínas (Farang et al., 2020), este cultivo iniciador o también conocido como granos de kéfir se adicionan a la leche de vaca y se recuperan después del proceso de fermentación.

Los microorganismos presentes en los granos de kéfir son los responsables del proceso de fermentación y los encargados de producir principalmente ácido láctico, etanol y CO₂ compuestos que le confieren un sabor ácido, consistencia cremosa, bajos niveles de alcohol y una ligera carbonatación (Yang et al., 2020). Varias investigaciones han demostrado que la presencia de la microflora mixta del kéfir junto con algunos productos metabólicos como ácidos orgánicos hacen que sea una bebida probiótica funcional con efectos promotores de la salud incluida la supresión y prevención de tumores, la inmunidad y alergia gastrointestinales, la cicatrización de heridas, la asimilación del colesterol y la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), propiedades antimicrobianas y la capacidad del kéfir para modificar la composición y actividad de la microbiota intestinal (Bourrie et al., 2016).

Debido al potencial que presenta el kéfir, se ha estudiado el uso de otros sustratos para su producción y posterior evaluación de características funcionales, alguno de los sustratos utilizados han sido la leche de otras especies animales, leche de coco, leche de soya, jugos de frutas o soluciones de azúcar y melaza (Leite et al., 2013). Una de las bebidas más estudiadas para la fermentación con granos

de kéfir ha sido la leche de soya, ya que posee un alto contenido de proteínas, isoflavonas y oligosacáridos (Baú et al., 2015). Por otro lado, la leche de almendra al ser una de las bebidas no lácteas más consumidas constituyen una fuente de proteínas, ácidos grasos monoinsaturados, fibra dietética, vitamina E, riboflavina y minerales esenciales (Barreca et al., 2020). Ambas bebidas de origen vegetal se han mantenido como un producto alimenticio que ofrece beneficios nutricionales para la salud, además de que no contiene colesterol ni lactosa y solo contiene pequeñas cantidades de ácidos grasos saturados (Vanga & Raghavan, 2018), por lo que investigaciones sugieren su contenido nutricional se podría mejorar a través de la fermentación.

El uso de leche de soya para la fermentación con granos de kéfir se ha reportado con éxito y se ha descrito como una bebida fermentada funcional, sin embargo, no se ha publicado estudios sobre el uso de leche de almendra para este fin. Además, es importante mencionar que el sustrato junto con otros parámetros como la microflora variable en los granos de kéfir, el tiempo de fermentación y las condiciones de almacenamiento y manipulación, alteran las propiedades físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de las bebidas de kéfir.

Formulación del problema

Muchos de los productos y bebidas lácteos son considerados alimentos probióticos, estos alimentos hoy en día comprenden entre el 60% y el 70% del mercado total de alimentos saludables y funcionales (Aspri et al., 2020), uno de ellos es el kéfir que poco a poco ha aumentado su popularidad y con ello su consumo por el buen impacto que genera en la salud y porque las personas están tendiendo a mejorar sus hábitos dietéticos con nuevos alimentos que promuevan la salud (Peluzio et al., 2021). Sin embargo, debido a que el consumo de leche de vaca ha disminuido como resultado de un aumento en el diagnóstico de problemas de intolerancia a la lactosa, alergias a las proteínas de la leche y la presencia

de colesterol (Silva et al., 2020), se buscan implementar los beneficios del kéfir en otras bebidas o sustratos de origen no lácteos que se asemejen a la leche bovina.

Frag (2020), menciona que el kéfir elaborado con leche entera es alto en colesterol, y en individuos con intolerancia a las proteínas lácteas se pueden observar reacciones alérgicas, por lo que a pesar de su condición de probiótico natural, la ingesta de kéfir lácteo no es apta para estas personas. Adicionalmente, es necesario mencionar que otros factores que contribuyen con el aumento en la demanda de nuevos productos de origen vegetal es el creciente número de consumidores veganos/vegetarianos (Łopusiewicz et al., 2020), la ética sobre el uso de animales y los problemas ambientales que generan los sistemas de producción lechera (Zhang et al., 2020), por lo que las personas pertenecientes a estos grupos también buscan sustitutos que puedan enriquecer su dieta y contribuir a una buena salud.

Justificación

Debido al crecimiento en la demanda de productos libres de leche y derivados, por lo factores mencionados anteriormente, surge la necesidad de desarrollar nuevos productos que suplan las necesidades para esta parte de la población, de hecho, según lo reportado en la investigación de Craig & Fresán (2021) la industria de leche no láctea ha crecido un 61% entre los años 2016 y 2018, en los Estados Unidos y se espera que a nivel mundial, para el año 2026 el mercado de alternativas lácteas alcance los \$ 25,1 mil millones, lo que genera que las empresas se enfoquen en el desarrollo de productos de este tipo.

Investigaciones demuestran que las bebidas de origen vegetal tienen importantes propiedades que promueven la salud, el proceso de fermentación puede mejorar mucho más los criterios nutricionales e incluso los atributos sensoriales de las bebidas (Tangyu et al., 2019). Se ha visto que cepas microbianas específicas pueden sintetizar vitaminas durante la fermentación por lo que, en

comparación con la fortificación sintética, la fortificación mediante los microorganismos productores de vitaminas naturales es reconocido como un procedimiento más seguro, natural y respetuosa con el medio ambiente (LeBlanc et al., 2011).

La leche de soya presenta uno de los fitoquímicos de mayor interés: las isoflavonas, que son considerados como uno de los componentes funcionales activos con capacidad de reducir algún riesgo de algunos tipos de cáncer, osteoporosis y otras enfermedades crónicas degenerativas no transmisibles (Silva et al., 2020). En la investigación realizada por Yang et al. (2020) se reporta que la leche de soya fermentada con un cultivo de kéfir mejoró el contenido de isoflavonas de aglicona y el sabor de la bebida, además sugieren al kéfir de leche de soya como una bebida fermentada funcional y como un alimento auxiliar para mujeres menopáusicas durante un período patológico específico.

La almendra es un fruto seco cuyos componentes le atribuyen las propiedades de un prebiótico al promover la fermentación por la microflora intestinal y estimulación selectiva del crecimiento o actividad de bacterias intestinales que contribuyen a la salud y el bienestar (Lamuel-Raventos & Onge, 2017). La leche de almendra es un análogo a la leche de soya, por lo que sus propiedades nutritivas también pueden mejorar mediante la fermentación. (Bernat et al., 2015) en su investigación concluye que la leche de almendras fermentada con bacterias potencialmente probióticas ejerce efectos inmunomoduladores positivos sobre los macrófagos, además Wansutha et al. (2018) menciona que la leche de almendras fermentada con cepas de BAL poseen propiedades antioxidantes y contenidos fenólicos más altos que los de la leche de almendras no fermentada.

Los antecedentes de leches vegetales fermentadas sugieren que tienen el potencial de ser un buen suplemento dietético principalmente para los consumidores exigen alternativas a la leche de origen vegetal por motivos de sostenibilidad, relacionados con la salud, estilo de vida y dietéticos. Además, el kéfir exhibe propiedades organolépticas de aroma, sabor, textura y buena sensación en la boca que van a

dependen del tiempo de fermentación, por ello es necesario establecer las condiciones adecuadas de elaboración de las bebidas para adaptarlas según los gustos y preferencias de los consumidores.

Objetivos de la investigación

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 días.
- 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.
- Determinar 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.

Hipótesis

- Las propiedades físico-químicas del kéfir de leche de almendra y el kéfir de leche de soya se ven alteradas conforme aumenta el tiempo de fermentación.
- El kéfir de leche de almendra y el kéfir de leche de soya cumplen con la calidad microbiológica establecida por la norma NTE INEN 2395 para leches fermentadas.
- El kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra elaborado con un tiempo de 24 horas de fermentación son los más aceptados por parte de los evaluadores.

Capítulo II. Marco Teórico

Leches de origen vegetal

La leche de origen vegetal se define como un tipo de emulsión diluida procedente de una variedad de plantas que presentan una distribución homogénea de sólidos solubles en suspensión y tienen una apariencia y uso similar a la leche de vaca (Mäkinen et al., 2016). Aunque la clasificación de los tipos de leches de origen vegetal/no lácteos no están bien definidos, Sethi et al. (2016) destaca una clasificación general, de acuerdo a las siguientes cinco categorías:

- a. Cereales: leche de avena, leche de arroz, leche de maíz, leche de espelta.
- b. Legumbres: leche de soya, leche de cacahuete, leche de lupino, leche de caupí.
- c. Frutos secos: leche de almendra, leche de coco, leche de avellana, leche de pistachos, leche de nueces.
- d. Semillas: leche de sésamo, leche de lino, leche de cáñamo, leche de girasol.
- e. Pseudocereales: leche de quinoa, leche de teff, leche de amaranto.

El procedimiento para la producción de las leches vegetales a escala industrial sigue un esquema general: el material vegetal o la materia prima se remoja, se muele en húmedo o en seco y luego se extrae la harina en agua seguido de un proceso de filtración o decantación para eliminar los desechos de la molienda y el material vegetal insoluble, finalmente se puede dar la adición de otros ingredientes y para mejorar la suspensión y estabilidad microbiana se hace una homogenización y pasteurización (Mäkinen et al., 2016).

La leche de soya fue la primera bebida alternativa que surgió como alternativa a la leche de vaca y actualmente es la más popular en el mercado de las leches vegetales (Jeske et al., 2018). Seguido de esto está la leche de almendra cuya popularidad se disparó y junto con la leche de soya han sido líderes en el mercado y venta de bebidas de fuentes vegetales.

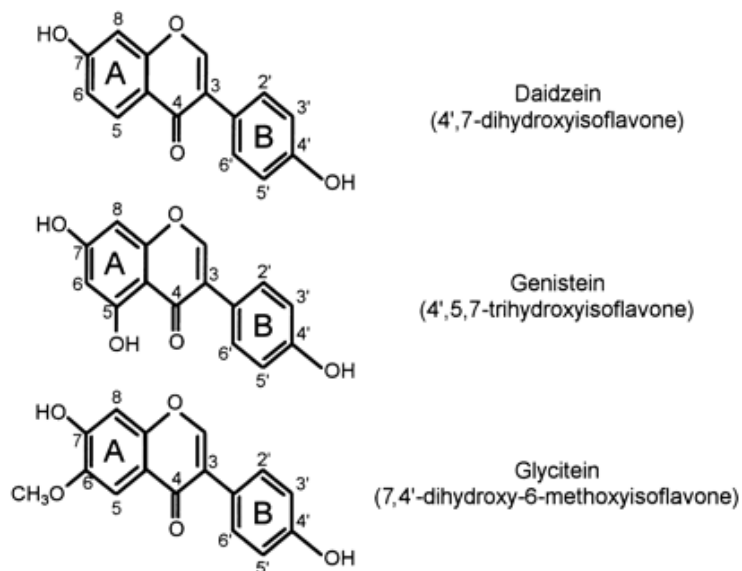
Leche de soya

La soya (*Glycine max* L.) es una leguminosa perteneciente a la familia *Fabaceae*, es considerada como una de las más importantes a nivel mundial ya que representa más del 60 % del consumo mundial de proteínas y aceites vegetales y es el cuarto cultivo de campo más grande por volumen (Vogel et al., 2021). Es originaria de China y Asia oriental, en la actualidad se cultiva principalmente en Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e India, pero ha destacado como una excelente fuente de alimento a nivel mundial por presentar alto contenido de proteínas (35-45%), fibras, fitoesteroles e isoflavonas, lo que hace que la soya sea una excelente fuente de alimento a nivel mundial (Ahmad et al., 2014).

La leche de soya se produce principalmente en Estados Unidos y es ampliamente consumida por los beneficios que se le atribuye gracias a la presencia de isoflavonas ya que han sido altamente estudiadas y han demostrado tener un efecto protector contra el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis y síntomas de la menopausia, por ser considerado un potente fitoestrogénico (Sekikawa et al., 2018) siendo la genisteína la isoflavona más abundante en la soya y la que se propone que es la más biológicamente activa. Otro de los beneficios que se le atribuye a la leche de soya incluye la ausencia de lactosa, libre de colesterol, alto valor nutritivo, alta digestibilidad y bajo costo (Sethi et al., 2016).

Figura 1

Estructuras de las isoflavonas primarias de la soya.



Nota. Adaptado de “Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects” (p. 442), por M. Messina, 1999, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 8(12).

Las isoflavonas o también denominados fitoestrógenos tienen una estructura similar a los estrógenos que son un tipo de hormonas femeninas, por lo que son capaces de unirse a los receptores de estrógeno (ER): ER α y ER β y a su vez generar efectos similares a los del estrógeno (Messina, 2016). En la leche de soya las isoflavonas aparecen principalmente como conjugadas, mientras que en los productos fermentados hay una gran producción de isoflavonas de agliconas que son los compuestos que mejoran la actividad biológica de la leche de soya (Hati et al., 2015). La composición de los macronutrientes de la soya difiere con respecto a otras leguminosas ya que es mucho más alta en grasas, moderadamente alta en proteínas y mucho más baja en carbohidratos, en la siguiente tabla se presenta la composición general de la soya y del extracto acuoso.

Tabla 1

Composición general de la soya y la leche de soya.

	Proteína (g)	Lípidos totales (g)	Carbohidratos (g)	Fibras Totales	Azúcar total (g)	Calcio (mg)	Energía (kcal)
Materia prima	38.6	25.4	30.2	17.7	4.2	138	469
Extracto acuoso	2.6	1.47	4.92	0.2	3.65	123	43

Nota. Adaptado de *USDA Food and Nutrient Database for Dietary Studies 2017-2018*, por U.S.

Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA, 2020,

<http://www.ars.usda.gov/nea/bhnrc/fsrg>.

Leche de almendra

El almendro (*Prunus dulcis* (Mill.) DA Webb) pertenece a la familia *Rosaceae*, es una planta originaria de regiones del Medio Oriente con climas mediterráneos, pero ha destacado a nivel mundial por su semilla denominada almendra. La producción mundial de almendras ronda los 1,7 millones de toneladas anuales, siendo EE. UU. el mayor productor (Barreca et al., 2020). El consumo regular de almendra se ha relacionado con una serie de efectos saludables como la reducción del riesgo de enfermedades como la obesidad, hipertensión, diabetes mellitus y el síndrome metabólico, debido a su capacidad reductora de LDL-c (Kalita et al., 2018), estos beneficios son atribuidos por su composición en macro y micronutrientes, los compuestos con propiedades beneficios que más destacan son los ácidos grasos poliinsaturados, fibra, vitaminas (vitamina E, vitamina B, etc.), minerales, fitoesteroles y polifenoles (Oliveira et al., 2019). Adicionalmente se ha informado que la almendra puede mejorar el perfil de la microbiota intestinal estimulando el crecimiento y actividad de bacterias intestinales que contribuyen a la salud y el bienestar (Lamuel-Raventos & Onge, 2017).

La leche de almendras se ha convertido en una de las leches alternativas a base de plantas más populares en los mercados de bebidas de América del Norte, la UE y Australia (Silva et al., 2020). Se destaca por contener componentes coloidales como proteínas-oleosinas, lípidos-cuerpos oleosos, polisacáridos, taninos, fitatos y sus diferentes complejos que interactúan entre sí, lo que la hace una sustancia coloidal termodinámica inestable que conduce a una separación de fases (Vanga & Raghavan, 2018). El perfil general de nutrientes de la almendra y leche de almendras se resume en la Tabla 2.

Tabla 2

Composición general de la almendra y la leche de almendra.

	Proteína (g)	Lípidos totales (g)	Carbohidratos (g)	Fibras Totales (g)	Azúcar total (g)	Calcio (mg)	Energía (kcal)
Materia prima	17.86	50	21.43	10.7	7.14	214	571
Extracto acuoso	0.42	1.04	7.92	0.4	7.5	188	42

Nota. Adaptado de “Health Issues and Technological Aspects of Plant-based Alternative Milk”, por Silva et al., 2020, *Food Research International*.

Productos lácteos fermentados

Los alimentos y bebidas fermentados han sido de los primeros productos alimenticios procesados consumidos por los humanos y han estado asociados con la capacidad de conferir beneficios además de tener propiedades nutricionales y funcionales mejoradas debido a la transformación de sustratos y formación de productos bioactivos que se generan por la acción de probióticos presentes en ellos (Marco et al., 2017). Los probióticos son microorganismos vivos que ejercen beneficios sobre la salud del huésped cuando se administran en proporciones adecuadas, se derivan de diferentes géneros

y especies por lo que han sido estudiados para una variedad de criterios de valoración de salud (Yan & Polk, 2020). Los probióticos que vienen en forma de productos lácteos fermentados son el yogur, koumis y kéfir, muchos de los cuales se han consumido durante cientos de años y que hoy en día han sido definidos y calificados por la Organización Mundial de la Salud (Scourboutakos et al., 2017).

Kéfir de leche de vaca

Origen

Varias investigaciones indican que el kéfir tuvo sus orígenes en las regiones de los Balcanes, en Europa del Este y en el Cáucaso 2000 años a.C., de hecho se cree que una de las tradiciones de las tribus del Cáucaso era pasar los granos de kéfir de generación en generación ya que eran considerados una fuente de riqueza familiar, además existe la propuesta de que el consumo de kéfir fue uno de los factores asociados con la larga esperanza de vida de la gente de dicha comunidad (Rosa et al., 2017). El kéfir, aunque no es tan popular como otros productos lácteos fermentados se ha extendido a Asia, África, América del Sur y Europa occidental y oriental (Slattery et al., 2019).

Características

El kéfir es una bebida de leche fermentada que se caracteriza por presentar una consistencia cremosa, sabor ácido, ligera efervescencia y bajos niveles de alcohol, se distingue de otros productos lácteos fermentados por la necesidad de un cultivo iniciador denominado granos de kéfir para su preparación (Dimidi et al., 2019). El olor y sabor característicos del kéfir se debe a la presencia de compuestos volátiles y no volátiles producto de la acción de varias especies bacterianas y levaduras a través de la lipólisis, la glucólisis y la proteólisis de los constituyentes de la leche (Farag et al., 2020). El proceso de fermentación genera principalmente ácido láctico, etanol y CO₂, que contribuyen con las propiedades organolépticas del kéfir, junto con otros compuestos bioactivos que son producidos en

menor cantidad, tales como el kefiran, péptidos, aminoácidos, acetaldehído, acetoína, diacetilo, ácido fólico, ácido acético, calcio y vitaminas (Yang et al., 2020).

Composición química

La composición química del kéfir es variable y depende de la fuente y el contenido de grasa de la leche, la composición y cantidad de los granos o cultivos y el proceso tecnológico de elaboración del kéfir, entre otros factores. Sin embargo, los valores de las características químicas más comúnmente reportados del kéfir elaborado a las 24 horas de fermentación son: pH 4.42 ± 0.01 , materia seca $9.62 \pm 0.03\%$, grasa $2.34 \pm 0.01\%$ (Magalhães et al., 2011), humedad 90%, proteína 3%, azúcar 6%, ácido láctico 0,6% - 1%, etanol 0.48%, CO₂ 201,7–277,0 mL/L (Frag et al., 2020).

Granos de kéfir

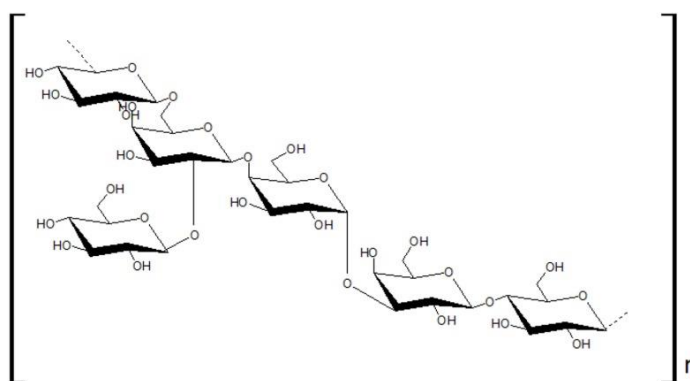
Los granos de kéfir están compuestos por una comunidad compleja de microorganismos que se encuentran inmovilizados en una matriz de polisacáridos y proteínas en donde coexisten e interactúan en asociación simbiótica. Existen dos tipos de granos de kéfir: unos para la preparación de kéfir de leche y otros para la preparación de kéfir de agua, este último también conocido como kéfir azucarado, muestra una apariencia quebradiza, son translúcidos, muestran un color variable amarillento que depende del medio azucarado que se use, son de tamaño pequeño que van de 1 a 10 mm de diámetro (Pendón et al., 2021). A pesar de esta distinción, en el presente estudio se hará énfasis en el kéfir de leche.

Los granos de kéfir de leche son un consorcio bacteriano que se caracteriza por tener la apariencia de masas gelatinosas e irregulares de color blanco o amarillo claro, con un tamaño que varía de 0,3 a 3,0 cm de diámetro, además de presentar una textura viscosa y firme y ser de consistencia elástica (Leite et al., 2013). En cuanto a su composición, los granos de kéfir contienen aproximadamente 83 % de agua, un 4 ± 5 % de proteínas y un 9 ± 10 % de un polisacárido llamado kefiran que es un

glucogalactano ramificado soluble en agua que consta de cantidades iguales de d -glucosa y d -galactosa (Bengoia et al., 2019). Este polisacárido tiene excelentes propiedades reológicas lo que lo permite mejorar la viscosidad del kéfir y de otros productos lácteos (Prado et al., 2015). En la Figura 2 se observa la estructura del kefiran.

Figura 2

Estructura del kefiran.



Nota. Adaptado “Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products”, por Prado *et al.*, 2015, *Frontiers in microbiology*. 6, 1177.

Composición microbiana de los granos de kéfir y del kéfir

La comunidad microbiana de los granos de kéfir abarca principalmente una mezcla compleja de bacterias del ácido láctico (BAL), levaduras y bacterias ácido acéticas (BAA) lo cual ha permitido clasificarlas en cuatro grupos: bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas, levaduras asimiladoras y no asimiladoras de lactosa (Prado et al., 2015). La composición compleja de estas especies microbianas proporciona la síntesis de metabolitos bioactivos, los cuales son esenciales para el crecimiento del grano y la inhibición de microorganismos patógenos o contaminantes alimentarios (Plessas et al., 2016).

Las especies microbianas que han sido más comúnmente identificadas en los granos de kéfir son:

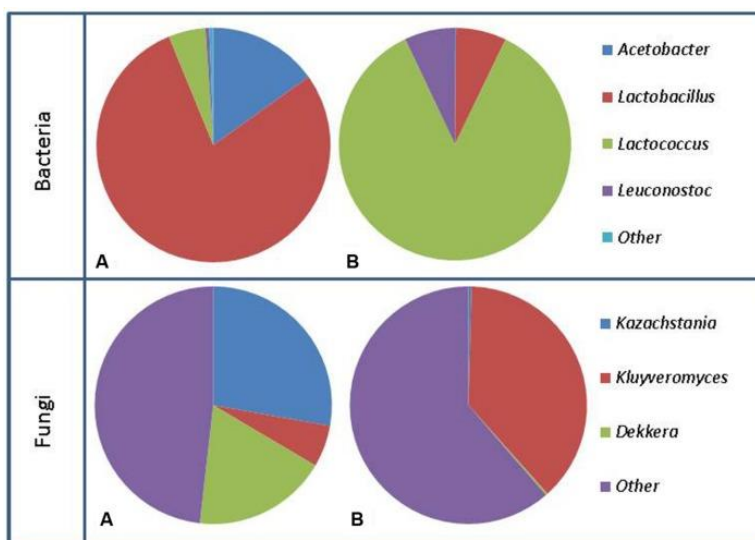
- Bacterias ácido lácticas (BAL): *Lactobacillus brevis*, *L. paracasei*, *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens*, *L. plantarum*, *L. kefiri*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophiles*.
- Bacterias ácido acéticas (BAA): *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter orientalis*.
- Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Candida Kefyr*, *Kluyveromyces marxianus*, *Leuconostoc mesenteroides*

Las interacciones simbióticas entre los microorganismos presentes en los granos de kéfir se evidencian por el aumento de los microorganismos y la biosíntesis de la matriz proteica y polisacáridos, en consecuencia, se da un incremento entre un 5% y un 7% de la biomasa de los granos durante el proceso de fermentación (Bengoa et al., 2019).

Magalhães et al. (2011) indican que en la bebida de leche fermentada con los granos de kéfir las bacterias ácido lácticas son las que predominan en el medio, seguido de las levaduras y de bacterias Gram negativas del género *Acetobacter*. Sin embargo, a pesar de que en la bebida kéfirada hay la presencia de los géneros microbianos presentes en los granos de kéfir, las proporciones de especies pueden diferir entre el grano y la leche, por ejemplo *L. kefiri* no es una especie predominante de *Lactobacillus* en los granos de kéfir, pero en la bebida fermentada final puede representar el 80 % de todas las especies de *Lactobacillus* (Dimidi et al., 2019). En la figura 3 se observa los cambios de la población bacteriana y levaduras del grano de kéfir y de la leche fermentada.

Figura 3

Representación de los cambios en la población bacteriana y de hongos. (A) Granos de kéfir (B). Leche fermentada.



Nota. Adaptado de "The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir." (p. 3), por Bourrie *et al.*, 2016, *Frontiers in microbiology*, 7.

La diferencia de la población microbiana entre el grano de kéfir y la bebida de kéfir está asociada a algunos factores que influyen en el proceso de fermentación como el tiempo, la temperatura, el grado de agitación, el tipo de leche, la relación inóculo grano/leche y distribución de microorganismos (Leite *et al.*, 2013). Pero también se ven afectadas las propiedades físico-químicas, organolépticas y nutricionales del kéfir.

Preparación

La preparación del kéfir se puede llevar a cabo utilizando cualquier tipo de leche, incluida la leche de vaca, cabra, oveja, camello, búfala e incluso leches de origen vegetal (Baú *et al.*, 2015). La preparación de kéfir se puede llevar a cabo mediante el método tradicional o por un proceso industrial. El método tradicional consiste en colocar directamente los granos de kéfir a la leche fría y pasteurizada,

se deja incubar de 18 a 24 h a 25 °C, luego de la fermentación, los granos se separan de la leche mediante filtración con un tamiz estéril, esto pueden conservarse en frío para una próxima inoculación, mientras que el kéfir se almacena a 4 °C durante un tiempo y luego está listo para el consumo (Altay et al., 2013).

El proceso industrial se puede dar mediante la fermentación de la leche con cultivos iniciadores de kéfir liofilizados comerciales, granos de kéfir tradicionales y el producto que queda después de la eliminación de los granos de kéfir (Vieira et al., 2021).

Actividad biológica

El consumo de kéfir se relaciona con una serie de beneficios para la salud incluidas propiedades fisiológicas, profilácticas y terapéuticas, esto como resultado de la acción de los microorganismos probióticos presentes en los granos de kéfir la cual son capaces de producir compuestos bioactivos durante el proceso de fermentación (Rosa et al., 2017). Según Bengoa et al. (2019) las principales propiedades biológicas del kéfir incluyen:

- Actividad antimicrobiana
- Supresión de tumores
- Propiedades cicatrizantes,
- Propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias
- Antiobesidad
- Reducción del colesterol
- Efectos antioxidantes
- Mejora de la tolerancia a la lactosa, alivio del hígado graso y potenciación de la flora bacteriana intestinal

Parte de los compuestos bioactivos del kéfir con los exopolisacáridos (EPS) principalmente el kefiran, el cual ha demostrado tener efectos inhibitorios de bacterias Gram negativas como *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, etc (Blandón et al., 2016), efectos anticancerígenos que se han evaluado en líneas celulares (Jenab et al., 2020), capacidad de modular la microbiota intestinal en modelos *in vitro* e *in vivo* (Vieira et al., 2021), y se demostró la actividad antioxidante *in vitro* junto con la protección de la proteína contra el daño oxidativo dependiente de la concentración (Chen et al., 2015). Entre otros beneficios que destaca el kefiran está la reducción del colesterol sérico total, el colesterol LDL sérico, los triglicéridos séricos, el colesterol hepático y los triglicéridos hepáticos (Azizi et al., 2021). Otros beneficios que se ha estudiado con respecto al kéfir es la disminución en la presión arterial y en la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), y la modulación inmunitaria (Vieira et al., 2021). A pesar de que existen una gran cantidad de estudios científicos en torno a los beneficios que puede proporcionar el kéfir, los científicos sugieren que se deben realizar más estudios en humanos y con una muestra representativa para demostrar el efecto del consumo de kéfir.

Productos no lácteos fermentados con granos de kéfir

La elaboración de kéfir a partir de bebidas no lácteas se da principalmente con los granos de kéfir de agua, para ello es necesario introducir los granos en una solución de sacarosa al 8% con frutos deshidratados como higos o pasas y para mejorar el sabor se puede adicionar rodajas de limón, la fermentación se da durante unos días y a temperatura ambiente (Gulitz et al., 2011). Varios estudios indican que los granos de kéfir de agua fermentan exitosamente agua de coco, suero de soya, jugo de cebolla, jugo de tomate (Pendón et al., 2021), además bebidas a base de pulpas de cacao (Puerari et al., 2012) y chocho (Łopusiewicz et al., 2020) también han obtenido buenos resultados. Sin embargo, el principal interés en esta investigación destaca el uso de granos de kéfir de leche, por lo que Dadkhah et al. (2011) y Gamba et al. (2020) reportaron la elaboración exitosa de kéfir de leche de soya usando

granos de kéfir de leche y hacen énfasis en que la fermentación con cultivos mixtos enriquece el contenido de isoflavonas bioactivas y aumentan la biodisponibilidad mineral en la fermentación de la leche de soja. Por otro lado Tangyu et al. (2019) concluye que el uso de cultivos mixtos tiene un gran potencial para mejorar la calidad nutricional y el perfil sensorial de los materiales vegetales y debido al enorme progreso en el campo, los estudios de biología de sistemas cuantitativos de fermentaciones de cultivos mixtos de alternativas de leche de origen vegetal podrían convertirse en el siguiente nivel de investigación para comprender mejor los procesos fisiológicos, celulares y moleculares subyacentes.

Evaluación sensorial

La evaluación sensorial es una ciencia cuantitativa utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar respuestas recopiladas como datos numéricos para establecer relaciones legales y específicas entre las características de un producto y la percepción humana a través de los sentidos: vista, olfato, tacto, gusto y oído (Lawless & Heymann, 2010). Este análisis se puede emplear para el desarrollo de un nuevo producto, para determinar los consumidores objetivos, los competidores del producto y evaluar nuevas ideas, esto ya que se identifica las características sensoriales imperativas que impulsan la aceptabilidad del producto (Kohyama, 2020).

De manera general, las pruebas sensoriales se clasifican en dos grandes grupos: pruebas analíticas y pruebas afectivas. Las pruebas analíticas tienen como objetivo evaluar la calidad de un producto, para ello es necesario la participación de catadores experimentados capaces de comparar la muestra con un patrón mental de calidad, por otro lado, las pruebas afectivas tienen como objetivo dar a conocer la aceptación del producto por parte de los consumidores, para ello requieren grandes grupos de degustadores no entrenados o grupos representativos de los consumidores con el fin de evitar un sesgo en los resultados (Severiano-Pérez, 2019). Las pruebas más utilizadas en la industria de alimentos e investigación son las pruebas hedónicas afectivas ya que evalúan directamente el agrado y desagrado del

consumidor, la operación básica de estas pruebas es catalogar respuestas limitadas enumeradas junto a opciones verbales, para ello existe un rango de números que van desde uno a nueve, siendo uno el valor más débil o de menor aceptación “me disgusta mucho”, cinco un valor neutro “no me gusta ni me disgusta” y nueve el valor más fuerte o de mayor aceptación “me gusta mucho” (Lawless & Heymann, 2010).

El análisis sensorial explora nuevas tecnologías para el desarrollo de productos y la comprensión del comportamiento del consumidor, razón por la cual es una herramienta ampliamente utilizada en el campo de la investigación.

Capítulo III. Materiales y Métodos

Granos de kéfir y activación

Los granos de kéfir se compraron en la tienda “Artesanías del Mundo” ubicada en la ciudad de Quito – Ecuador, y se cultivaron en leche de vaca hervida a 25°C durante 20 días, para garantizar su capacidad de fermentar el medio. Los medios fueron reemplazados dos veces por semana por medio nuevo y se lavaron con agua filtrada.

Toma de muestras de leches vegetales

La leche de soya y la leche de almendra se compraron en un supermercado local. Las muestras de cada leche utilizadas para el proceso de producción de Kéfir se tomaron de acuerdo con la norma INEN-ISO 707:2014. Ambas bebidas fueron mezcladas mediante inversión y evitando la formación de espuma. Se recogió una muestra total de 1 500 mL de ambas leches en recipientes de vidrio estériles de dos litros de capacidad, luego a cada leche se agregó 2g/100 mL de sacarosa para aumentar la concentración y se agito hasta disolver con una cuchara de madera estéril.

Inoculación de los granos de kéfir

Tanto para la elaboración del kéfir de leche de soya como para el kéfir de leche de almendra se definió tres tiempos de fermentación: 18, 24 y 48 horas. Para cada bebida se siguió el siguiente procedimiento:

Según lo reportado por Gamba et al. (2020) los granos de kéfir se cultivaron en cada medio a una concentración de 10% (p/v), para ello se pesaron 150 gramos de granos de kéfir en una balanza y se colocó en los respectivos recipientes estériles ya con la leche vegetal, luego se cerró el recipiente y se conservó a 25°C, hasta cumplir con los tiempos de fermentación establecidos. Después de la fermentación, los granos se separaron por filtración con un cernidor y el sobrenadante se designó como la bebida de kéfir.

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

Los análisis físico-químicos y microbiológicos se realizaron 24 horas después de la obtención de cada bebida de kéfir, mientras que el análisis sensorial se realizó el mismo día de la obtención de las bebidas. Se designó 500 mL para los análisis físico-químicos, microbiológicos y sensoriales, las muestras fueron tomadas de acuerdo a la norma INEN-ISO 707:2014. Las bebidas se almacenaron en recipientes de vidrio estériles en un refrigerador (1-5°C) para su posterior análisis.

El análisis físico-químico y microbiológico se realizó en el laboratorio de enzimología del CICTEC de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Determinación del aspecto, color y olor

Para la determinación del aspecto, color y olor se colocó 60 mL de cada bebida, obtenida inmediatamente después de la fermentación, en un recipiente de vidrio limpio y seco, luego se llevó el recipiente a una zona clara y se anotó lo observado. Para el olor se acercó el recipiente hasta la nariz y rápidamente se anotó lo percibido.

Determinación de las propiedades físico-químicas del kéfir de leche de soya, kéfir de leche de almendra y las leches sin fermentar

pH

Se utilizó un potenciómetro digital (selpHbalance) que fue calibrado con soluciones estándar de pH 4.0, 7.0 y 10.0 antes de su uso, la muestra se colocó en un vaso de precipitación de 250 mL y se realizó la lectura del pH. Los datos se recogieron una vez que el equipo se estabilizara.

Densidad

La densidad se determinó por el método gravimétrico empleando el procedimiento establecido por la norma INEN 391:2012. Para ello se utilizó un picnómetro de 25 mL de capacidad y una balanza analítica. El picnómetro se lavó varias veces con agua corriente, luego con agua destilada y finalmente

con etanol antes de cada uso. Inicialmente se pesó el picnómetro vacío, luego se llenó el picnómetro con agua destilada hasta la marca respectiva evitando la formación de burbujas de aire, se colocó la tapa y se pesó, finalmente se realizó el mismo procedimiento, pero llenando el picnómetro con la muestra a analizar. Para el cálculo de la densidad se utilizó la siguiente expresión:

$$\text{densidad relativa (g/mL)} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}$$

Donde:

m₁: masa del picnómetro vacío (g)

m₂: masa del picnómetro con agua (g)

m₃: masa del picnómetro con la muestra (g)

Azúcar total

Para la obtención del azúcar total se midió los grados Brix de las muestras mediante el uso de un refractómetro de Abbe. El porcentaje de azúcar total se expresó en gramos de azúcar por 100 mL de muestra mediante la siguiente conversión:

$$1 \text{ }^\circ\text{Bx} = 1\% \text{ de contenido de azúcar en 100 gramos de solución o } 0,1 \text{ L.}$$

Acidez titulable

El contenido de ácido láctico se determinó mediante una titulación siguiendo el procedimiento establecido por la norma INEN 13:1984. Como primer paso, se colocó 10 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, en cada muestra se agregó tres gotas de fenolftaleína 1% y se dejó caer gota a gota NaOH 0,1N (agente titulante) a través de la bureta y con agitación constante. La titulación se

detuvo cuando se evidenció un ligero cambio de color hacia rosado que se mantuvo constante por lo menos 30 segundos después de agitar la bebida. Para determinar el contenido de ácido láctico se utilizó la siguiente expresión:

$$A = 0,090 \frac{V \times N}{m_1 - m} \times 100$$

Siendo:

A: Acidez titulable, en porcentaje en masa de ácido láctico

V: Volumen de la solución de NaOH 0,1 N empleado en la titulación (mL)

N: Normalidad de la solución de NaOH

m: Masa del matraz Erlenmeyer vacío (g)

m₁: masa del matraz Erlenmeyer con la muestra (g)

El resultado se expresó en miligramos de ácido láctico por 100 mL de muestra.

Análisis microbiológico

Tinción Gram

Se tomaron muestras del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra a los diferentes tiempos de fermentación y se sometieron a una tinción Gram. Para ello se colocó una gota de cada muestra en un portaobjetos y se la fijo pasando la placa por el mechero, posteriormente se agregaron los colorantes en el siguiente orden y tiempos:

1. Cristal violeta, 1 minuto
2. Lugol, 1 minuto
3. Decolorante 15 segundos
4. Safranina, 1 minuto

Las muestras fueron enjuagadas con agua destilada luego de colocar los colorantes, para eliminar el exceso. Las colonias obtenidas en los diferentes medios de cultivo también se sometieron a una tinción Gram.

Recuento microbiano

Procedimiento para diluciones. Las diluciones se realizaron de acuerdo con el procedimiento establecido por la norma INEN 1529-2. El diluyente utilizado fue agua destilada, la suspensión inicial o dilución primaria (10^{-1}) se realizó transfiriendo 10 mL de muestra a un frasco con 90 mL de diluyente seguido de agitación al frasco para homogenizar todo el contenido. Para las diluciones seriadas se tomó 1 mL de la suspensión inicial y se colocó en un tubo estéril con 9 mL de diluyente, el tubo se agitó hasta asegurarse que la muestra este homogénea. El procedimiento se repitió hasta la dilución 10^{-5} .

Recuento de microorganismos ácido lácticos, mohos y levaduras y coliformes totales. Se utilizó medio MRS (Man-Rogosa-Sharpe) para el recuento de bacterias ácido lácticas, PDA (Agar Dextrosa y Papa) para el recuento de hongos y levaduras y MKL (Agar MacConkey) para el control de calidad de Coliformes totales.

Método de siembra por extensión en placa. Se siguió el procedimiento establecido por la norma INEN 1529-5:2006. En una placa de agar previamente fundido y rotulada, se colocó 0,1 mL de cada una de las diluciones decimales, iniciando por la dilución de menor concentración, luego el inóculo se mezcló con una aza de Drigalski y se esperó a que la muestra se absorba en el agar para invertir la placa e incubarla. Las muestras sembradas en placas MRS se incubaron durante 72 h, las placas PDA durante 48 h y las placas MKL durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación se seleccionó las placas que presentaron de 30 – 300 colonias. Para hallar el número de UFC/ mL se utilizó la siguiente expresión:

$$UFC/mL = \#Colonias \times \frac{\text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de inoculación}}$$

Evaluación de las propiedades sensoriales

Evaluadores

La encuesta se realizó a un grupo de 20 evaluadores no experimentados mayores de 18 años, hombres y mujeres, del sector San Antonio de Pichincha y Sangolquí. Se sirvieron aproximadamente 25 mL de cada bebida de kéfir en vasos de plástico transparente de 60 mL de capacidad, la evaluación se llevó a cabo bajo una iluminación adecuada. Los evaluadores recibieron agua para enjuagarse la boca entre las pruebas.

Atributos sensoriales

Los atributos sensoriales a evaluar fueron color, olor, textura, sabor y acidez, utilizando una escala hedónica de 5 puntos (Tabla 3), siendo 1 el nivel de máximo disgusto o rechazo, 3 el nivel medio neutro y 5 el máximo nivel de gusto o aceptabilidad.

La encuesta para la evaluación de los atributos sensoriales se realizó en 3 tiempos, de acuerdo a como se obtenían las bebidas, por medio de la plataforma digital Google forms.

Tabla 3

Escala hedónica para la evaluación de los atributos sensoriales.

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

Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos para la caracterización físico-química y microbiológica se presentan como media, la toma de datos para los ensayos físico-químicos se realizaron al menos por quintuplicado, mientras que los ensayos microbiológicos se realizaron al menos por duplicado. El análisis de los datos y las comparaciones entre réplicas en cada grupo se realizaron mediante la prueba de Duncan al 0,05 de significancia en el software InfoStat. Para el análisis de las propiedades sensoriales se utilizó el software R Studio e InfoStat, además se realizó una prueba Duncan al 0,05 de significancia para comparar las medias para cada atributo a los diferentes tiempos y se realizó una prueba de independencia de Chi-cuadrado Pearson.

Capítulo IV. Resultados

Análisis físico-químico

Apariencia, color, olor

El aspecto, color y olor del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra fermentado a las 18, 24 y 48 horas presentaron las mismas características descritas en la Tabla 4.

Tabla 4

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

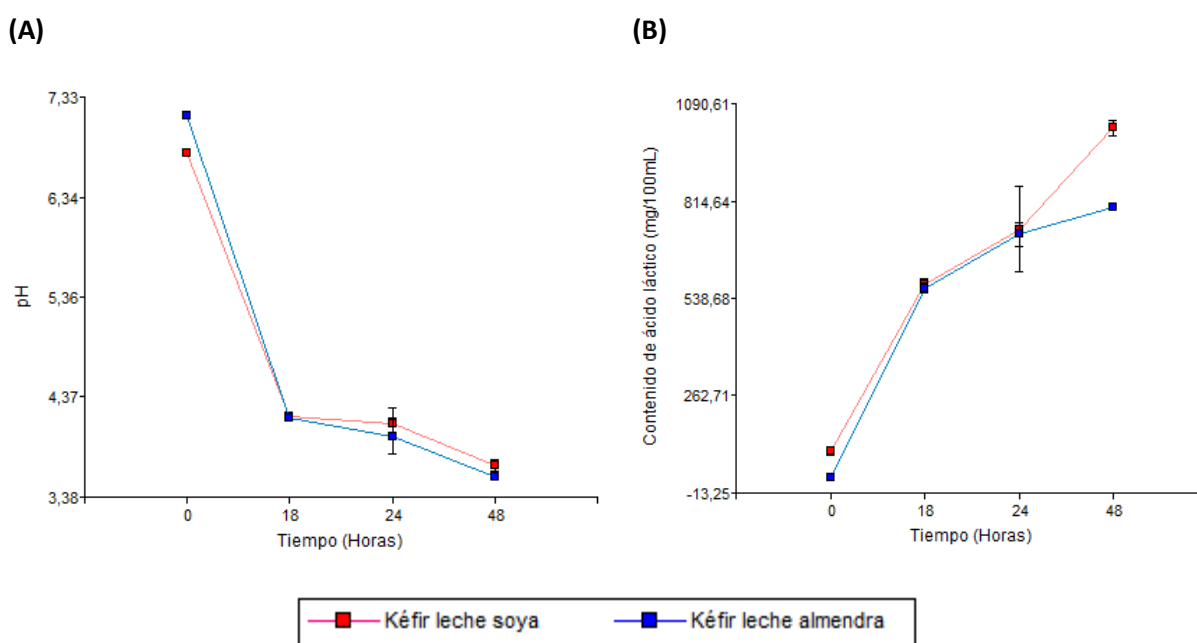
pH y contenido de ácido láctico

La fermentación de la leche de soya y leche de almendra resultó en una disminución del pH conforme aumentaba el tiempo de fermentación (Figura 4A). Para ambos casos, los análisis indican que hubo diferencia estadísticamente significativa (valor- $p < 0.05$) entre el valor del pH de las leches sin fermentar y los valores del kéfir a las 18, 24 y 48 h (Tabla 5), sin embargo, en el kéfir de leche de soya se observa que entre los valores de pH a las 18 y 24 h no hubo diferencia estadísticamente significativa (valor- $p > 0,05$), mientras que para el kéfir de leche de almendra todos los valores de pH son significativamente diferentes.

La disminución del pH se asocia con el aumento de la acidez titulable que es equivalente al contenido de ácido láctico en el medio. En la Figura 4B se observa que tanto en el kéfir de leche de soja como en el kéfir de leche almendra hubo un aumento significativo (valor- $p < 0,05$) del contenido de ácido láctico después de la fermentación a 18, 24 y 48 h, adicionalmente para ambos casos, todos los valores del contenido de ácido láctico mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5).

Figura 4

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



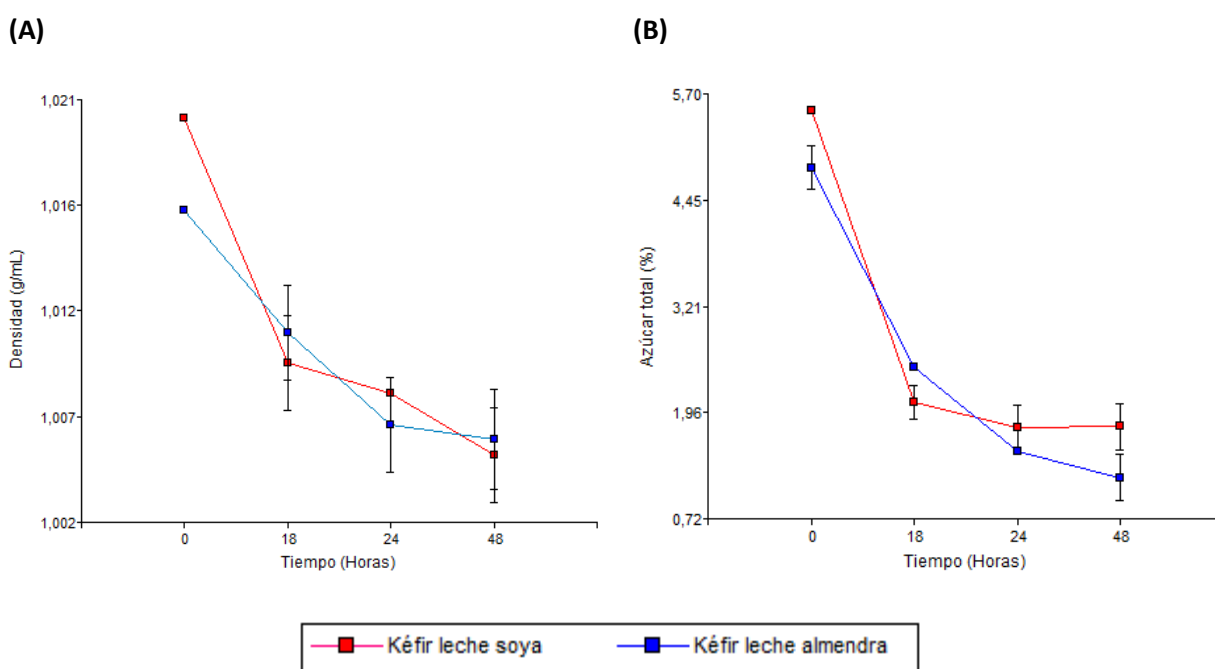
Densidad y azúcar total

Los grados Brix ($^{\circ}$ Brix) tienen una relación directa con la densidad, a mayor $^{\circ}$ Brix hay una mayor densidad, en este caso la fermentación de la leche de soja y de la leche de almendra resultó en una disminución de los $^{\circ}$ Brix (expresado como porcentaje de azúcar total) y de la densidad conforme aumentaba el tiempo de fermentación (Figura 5).

La Tabla 5 indica que para ambos casos hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor de la densidad de las leches sin fermentar y las leches fermentadas a las 18, 24 y 48 horas (valor-p < 0,05), sin embargo, entre los valores a las 18 y 24 horas del kéfir de leche de soya no se encontró diferencia estadísticamente significativa, al igual que entre los valores de 24 y 48 horas del kéfir de leche de almendra.

Figura 5

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.



Los valores de azúcar total mostraron diferencia estadísticamente significativa (valor-p < 0,05) entre el valor de azúcar total de las leches sin fermentar y los valores del kéfir a las 18, 24 y 48 h (Tabla 5). Sin embargo, para el kéfir de leche de soya los valores de azúcar total a las 18 y 24 h junto con los valores de azúcar total a las 24 y 48 h no mostraron diferencia estadísticamente significativa (Valor-p >

0,05), mientras que en el kéfir de leche de almendra, todos los valores de azúcar total son significativamente diferentes.

En la Tabla 5 se resumen los valores de los parámetros físico-químicos analizados tanto para las leches sin fermentar y para las muestras del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra elaborado a diferentes tiempos de fermentación (18 h, 24 h y 48 h).

Tabla 5

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 ^a	4.19 ^b	4.17 ^b	3.71 ^c	7.15 ^a	4.17 ^b	4.05 ^c	3.58 ^d
Densidad (g/mL)	1.02 ^a	1.009 ^b	1.008 ^b	1.005 ^c	1.016 ^a	1.011 ^b	1.007 ^c	1.006 ^c
Azúcar total (%)	5.5 ^a	2.08 ^b	1.83 ^{b,c}	1.75 ^c	4.83 ^a	2.5 ^b	1.5 ^c	1.25 ^d
Contenido de ácido láctico (mg/100mL)	106.62 ^a	578.14 ^b	689.27 ^c	1019.63 ^d	30.03 ^a	567.63 ^b	707.29 ^c	795.13 ^d

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. Ver Anexo 2.1.

La diferencia significativa que se observa entre los valores obtenidos a los tres tiempos de fermentación, para cada parámetro físico-químico analizado, se debe a la actividad metabólica de los microorganismos presentes en ambas bebidas fermentadas.

Análisis microbiológico

La tinción Gram realizada a las muestras de kéfir de leche de soya y de kéfir de leche índico la presencia de bacilos, cocobacilos y cocos Gram positivos agrupados en pares o cadenas cortas, en ambas bebidas, la presencia de estos microorganismos se confirmó mediante otra tinción Gram realizada a las colonias presentes en los medios MRS y PDA. Estos resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6

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 ⁺	Colonias blancas y amarillas, lisas, circulares de margen entero	Bacilos largos y cortos	Gram ⁺	Colonias blancas circulares, cremosas y de borde entero	Levaduras ovoides y circulares	Moradas
Cocobacilos	Gram ⁺		Cocobalicos	Gram ⁺			
Cocos	Gram ⁺	Bacilos largos	Gram ⁺				
Levaduras	Moradas	Colonias blanquecinas rugosas e irregulares	Cocos	Gram ⁺			

Nota. Los resultados que se presentan corresponden a lo observado en el kéfir de leche de soya y kéfir de leche de almendra. Ver Anexo 3.1.

La Tabla 7 indica los recuentos viables para el kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra a los diferentes tiempos de fermentación, en ambos casos se alcanzaron recuentos viables de al menos 10^7 UFC/mL tanto para las BAL como para los hongos y levaduras, mientras que no hubo crecimiento de Coliformes totales en ninguna muestra de kéfir.

Tabla 7

Recuentos viables para el kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra.

Recuentos viables (UFC/mL)							
		Kéfir de leche de soya			Kéfir de leche de almendra		
Medio	Población microbiana	18 h	24 h	48 h	18 h	24 h	48 h
MRS	Bacterias ácido lácticas	1,57x10 ⁷	4,90x10 ⁷	7,60x10 ⁷	3,01x10 ⁷	1,28x10 ⁷	3,60x10 ⁷
PDA	Hongos y levaduras	1,26x10 ⁷	6,60x10 ⁷	8,70x10 ⁷	1,60x10 ⁷	1,32x10 ⁷	2,42x10 ⁷
MKL	Coliformes totales	0	0	0	0	0	0

Nota. Los recuentos viables se realizaron a las placas que presentaban de 30 a 300 UFC. Ver Anexo 3.2.

Las UFC/mL obtenidas en el recuento del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra se compararon con lo establecido en la norma INEN 2395 para leches fermentadas, los resultados se muestran en la Tabla 8. Para ambos casos se observa que tanto la cantidad de microorganismos específicos como los requisitos microbiológicos en la leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación están por encima del requisito mínimo establecido para los productos de kéfir, por lo que cumplen con los criterios de calidad.

Tabla 8

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	2,83x10 ⁷	1,15x10 ⁸	1,63x10 ⁸	Cumple	4,61x10 ⁷	3,12x10 ⁷	6,02x10 ⁷	Cumple
Bacterias probióticas	10 ⁶ UFC/g	1,57x10 ⁷	4,90x10 ⁷	7,60x10 ⁷	Cumple	3,01x10 ⁷	1,80x10 ⁷	3,60x10 ⁷	Cumple
Levaduras	10 ⁴ UFC/g	1,26x10 ⁷	6,60x10 ⁷	8,70x10 ⁷	Cumple	1,60x10 ⁷	1,32x10 ⁷	2,42x10 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

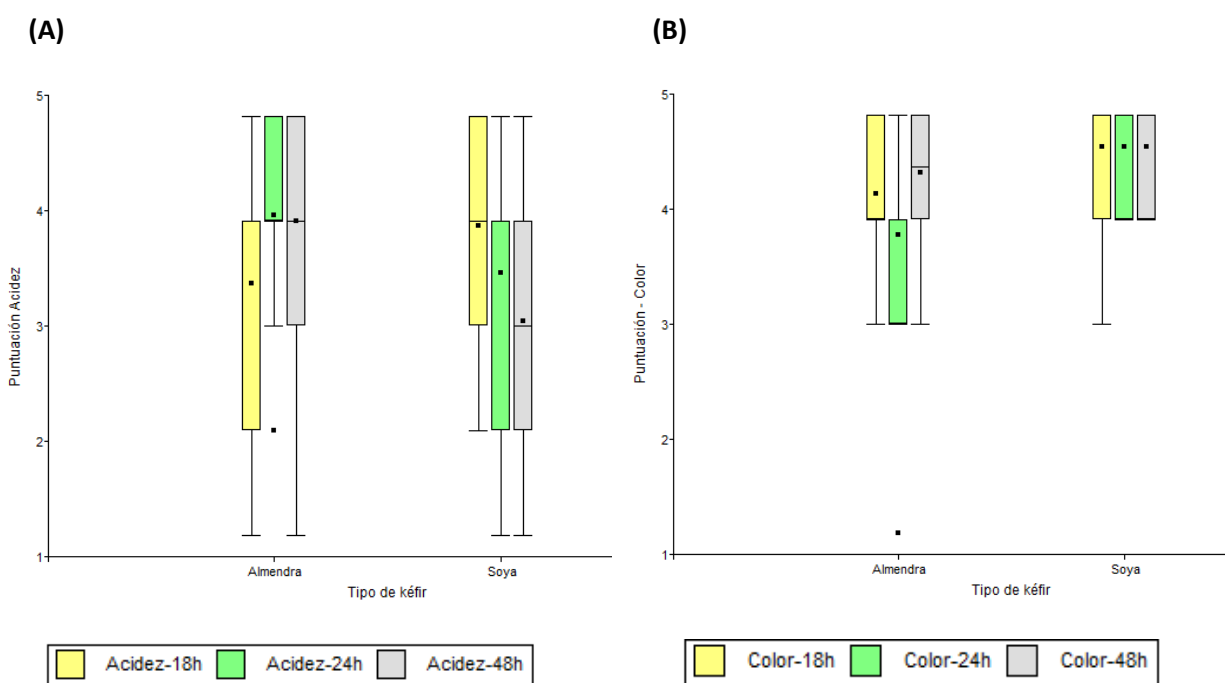
Evaluación sensorial

Los atributos sensoriales del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra fueron evaluados mediante apariencia y olfato-gustativa. Para la apariencia se evaluó el color y textura, mientras que las características olfato-gustativas fueron evaluadas a través del olor, sabor y la acidez. En la Figura 6 se observa la dispersión de las puntuaciones medias para el atributo acidez (Figura 6A) y para el atributo color (Figura 6B) para ambas bebidas y a los tres tiempos de fermentación. Para la acidez se observa que el rango de puntuaciones es más grande para todos los casos a excepción del kéfir de leche

de almendra a las 24 horas en la que se observa rangos más pequeños, mientras que para el color en todos los casos se observan rangos más pequeños. Para ambos atributos en el kéfir de leche de almendra a las 24 horas se observan datos atípicos. Los diagramas de los demás atributos se muestran en el Anexo 4.1.

Figura 6

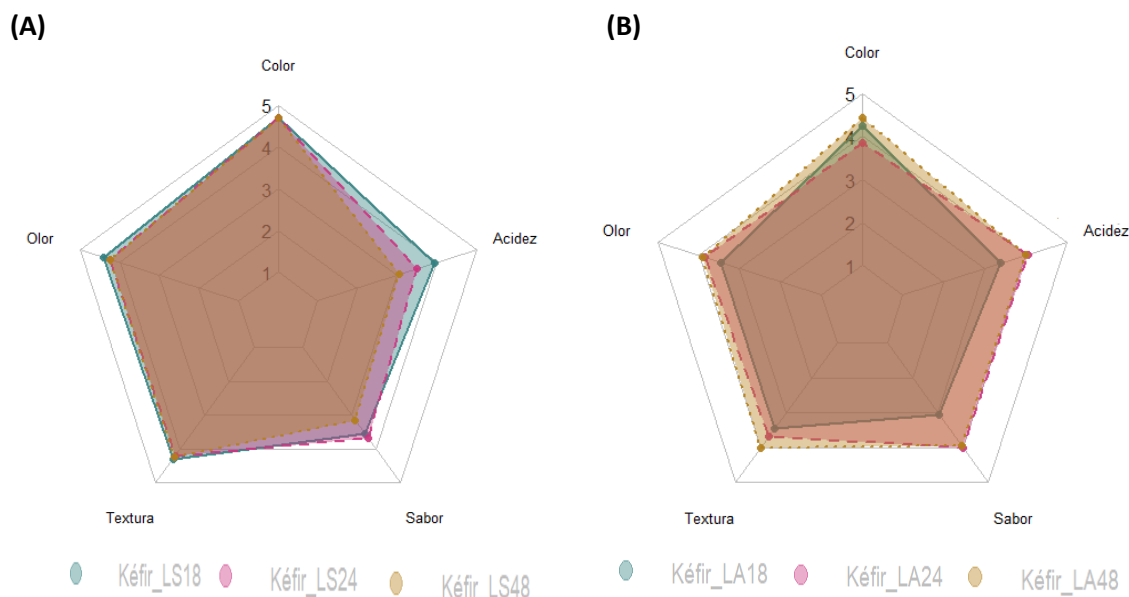
Diagrama de cajas para la evaluación de los atributos **(A)** acidez y **(B)** color, del kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra fermentado a las 18h, 24h y 48h.



Las puntuaciones medias para cada uno de los atributos evaluados en ambas bebidas se presentan en un diagrama de araña que además indica de forma visual las diferencias entre las puntuaciones de las bebidas fermentadas a las 18h, 24h y 48h para cada atributo.

Figura 7

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



Nota. Kéfir_LS: kéfir de leche de soja. Kéfir_LA: kéfir de leche de almendra

En la Figura 7A se muestra que para el kéfir de leche de soja los atributos color, olor y textura a las 18, 24 y 48 horas tuvieron las puntuaciones medias más altas (> 4), adicionalmente no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los valores de estos atributos a las 18, 24 y 48 horas (Tabla 9). Por otro, para el atributo sabor se observan puntuaciones más bajas, siendo el kéfir de leche de soja a las 48h el valor más bajo, sin embargo, estos valores resultan que no son estadísticamente diferentes ($\text{valor-p} > 0,05$), a diferencia del atributo acidez la cual si muestra diferencia estadísticamente significativa ($\text{valor-p} > 0,05$) entre el kéfir de leche de soja fermentado hasta las 18h y el kéfir de leche de soja fermentado hasta las 24h.

La Figura 7B correspondiente al kéfir de leche de almendra indica que, para la bebida de 18 horas, todos los atributos a excepción del color tuvieron puntuaciones bajas, por otro lado, para las bebidas a las 24 y 48 horas los atributos con mayor puntaje medio fueron el olor, sabor y la acidez, pero para el color y la textura para la bebida de 24 horas estos fueron más bajos en comparación con los puntajes de la bebida a las 48 horas. Sin embargo, la Tabla 9 indica que para las puntuaciones medias de los atributos olor, textura y acidez del kéfir de leche de almendra a las 18h, 24h y 48h no existen diferencias que sean estadísticamente significativas, y que solo existen diferencias estadísticamente significativas para los atributos color y sabor.

Tabla 9

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 ^a	4.7 ^a	4.7 ^a	4.25 ^{a, b}	3.85 ^a	4.45 ^b
Olor	4.4 ^a	4.25 ^a	4.25 ^a	3.45 ^a	3.85 ^a	3.9 ^a
Textura	4.3 ^a	4.2 ^a	4.25 ^a	3.45 ^a	3.7 ^a	4.0 ^a
Sabor	3.55 ^a	3.7 ^a	3.15 ^a	3.05 ^a	4.0 ^b	3.95 ^b
Acidez	3.95 ^a	3.5 ^{a,b}	3.05 ^b	3.4 ^a	4.05 ^a	4.0 ^a
Media	4.18 ^a	4.07 ^a	3.88 ^a	3.52 ^a	3.89 ^{a,b}	4.06 ^b

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. Ver Anexo 4.2.

En cuanto a la aceptación general, en la Tabla 9 se muestra que en el kéfir de leche de soya no hubo diferencias estadísticamente significativa entre las puntuaciones generales medias de las bebidas fermentadas a las 18, 24 y 48 horas, mientras que para el kéfir de leche de almendras, hubo diferencias estadísticamente significativa entre el kéfir fermentado a las 18 horas y el kéfir fermentado a las 48

horas, lo cual establece que la bebida con mayor aceptación es el kéfir de leche de almendra fermentado hasta las 48 horas, con una puntuación general media de 4.06. Por otro lado, en las Figuras 8 y 9 se observa que, para el kéfir de leche de soya fermentado hasta las 18 horas y el kéfir de leche de almendra fermentado hasta las 48 horas, los diagramas de caja presentan rangos menores lo que indica que las puntuaciones se encuentran entre 3 y 5 para todos los atributos evaluados, por lo que las respuestas son más homogéneas para estos casos.

Figura 8

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

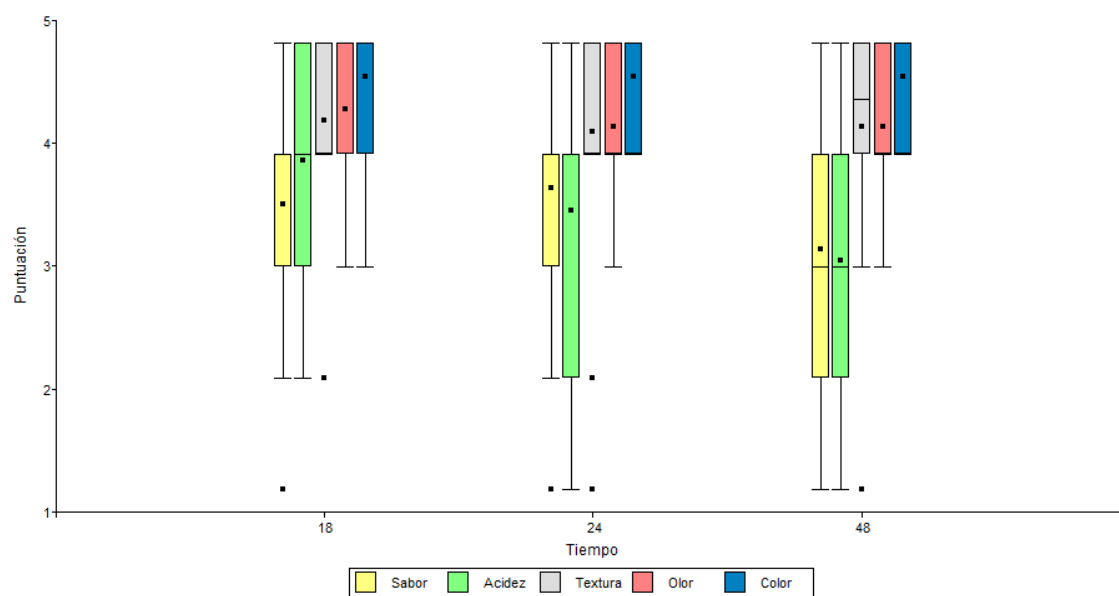
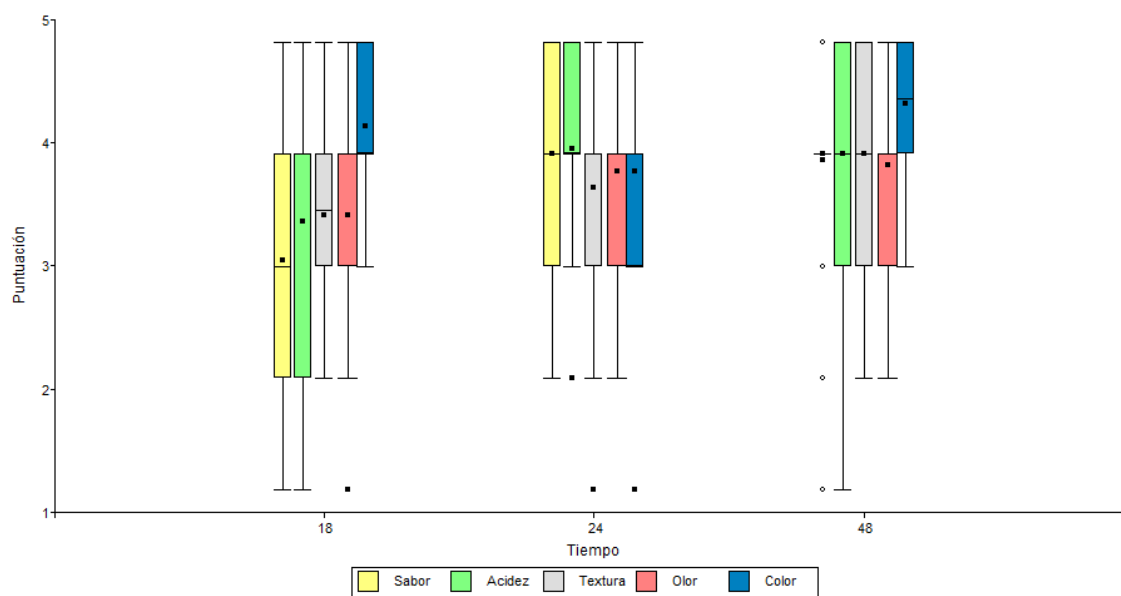


Figura 9

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



Adicionalmente se realizó una prueba de independencia de Chi-cuadrado para determinar si los puntajes de los atributos dependen o no del tiempo de fermentación, para eso se estableció lo siguiente:

H_0 : Las puntuaciones de los atributos sensoriales del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra son independientes del tiempo de fermentación.

H_1 : Las puntuaciones de los atributos sensoriales del kéfir de leche de soya y del kéfir de leche de almendra son dependientes del tiempo de fermentación.

La tabla 10 indica que, tanto para el kéfir de leche de soya como para el kéfir de leche de almendra, las puntuaciones o aceptabilidad general de ambas bebidas son independientes del tiempo de fermentación.

Tabla 10

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

Finalmente se estableció intervalos de confianza (Anexo 4.3) para determinar la aceptabilidad general, en el caso del kéfir de leche de soya se obtuvo que la aceptabilidad general media se encuentra entre (3.74 - 4.34), mientras que para el kéfir de leche de almendra se encuentra entre (3.62 – 4.02), por lo que en ambas bebidas tuvieron un nivel de aceptación medio sin rechazo extremo, según la escala hedónica.

Capítulo V. Discusión

Los cambios que se presentan en la composición de la leche de soya y la leche de almendra se deben al crecimiento y actividad de los microorganismos provenientes de los granos de kéfir en ambos medios. La producción de ácido en el kéfir depende del crecimiento de dichos microorganismos y su capacidad para fermentar los carbohidratos presentes en el medio, en la leche de soya los principales carbohidratos presentes son la sacarosa, la rafinosa y la estaquiosa (Dadkhah et al., 2011), mientras que en la leche de almendra son la sacarosa, rafinosa y glucosa (Barreca et al., 2020). En las bebidas lácteas, los microorganismos de los granos de kéfir consumen principalmente sacarosa para el proceso de fermentación (Zhao & Shah, 2014), lo que da como resultado un incremento en el contenido de ácido láctico y una disminución de los valores de pH del medio fermentado, tal como se muestra en la Figura 4. Por otro lado, los °Brix (expresado como porcentaje de azúcar total) representan los sólidos solubles o azúcares presentes en el medio (Magwaza & Opara, 2015), estos al ser consumidos por las bacterias y levaduras durante el proceso de fermentación hacen que las bebidas sean más fluidas generando así una disminución de la densidad (Figura 5A) y a su vez resulta en una disminución del azúcar total (Figura 5B). El tiempo de fermentación es otro de los parámetros que influye en las propiedades del kéfir ya que un tiempo de fermentación más largo significa más tiempo disponible para que los microorganismos actúen (Suriasih et al., 2020), es por eso que se observan diferencias significativas entre los valores de las bebidas fermentadas a las 18, 24 y 48 horas para la mayoría de los parámetros físico-químicos analizados (Tabla 5).

El valor de pH y de ácido láctico del kéfir de leche de soya a las 24 horas de fermentación es de 4.14 y 689.27 mg/100 mL respectivamente, lo cual se asemeja a lo reportado por Gamba et al. (2020) con un pH de 4.40 ± 0.05 y contenido de ácido láctico de 697.7 ± 15.6 mg/100 mL para un kéfir de leche de soya elaborado a un 10% (p/v), sin embargo, el contenido de azúcar total obtenido en este estudio es

de 1.83% mientras que en el estudio de Gamba es de 0.87%, esta diferencia puede ser por la adición de 2g/100mL de sacarosa que se realizó a las muestras de leches antes de la fermentación, esto con el fin de mejorar el crecimiento y acidificación de los granos de kéfir (Dadkhah et al., 2011). Por otro lado, no existen reportes de leche de almendra fermentada con cultivo de kéfir, sin embargo se ha reportado la elaboración de bebidas funcionales de almendra mediante la adición de cultivo de BAL al 1% (v/v), en donde se ha llegado a un pH de 4,7 (Wansutha et al., 2018) y 4.65 (Bernat et al., 2014) a las 24 horas de fermentación, la diferencia entre estos valores de pH y lo obtenido en este estudio (pH 4.05 para el kéfir elaborado a las 24 horas,) es por la diferencia de la población microbiana y la cantidad que se añadió al medio, además Leite et al. (2013) menciona que en el kéfir realizado tradicionalmente la proporción de grano/leche afecta el pH, la viscosidad, el perfil microbiológico del producto final, y otros parámetros.

Varias investigaciones sugieren que el pH del kéfir se mantenga en un valor de 4 a 5 y con un máximo de 1g/100 mL de ácido láctico ya que valores menores de pH genera la acumulación de ácido en la leche lo que puede resultar en un sabor desagradable y en la disminución de los microorganismos probióticos (Baú et al., 2015). En este estudio, los valores de pH para el kéfir de leche de soya y el kéfir de leche de almendra se mantienen en dicho rango, a excepción de las bebidas elaboradas a 48 horas que presentan valores de 3.71 y 3.58 respectivamente. En cuanto al contenido de ácido láctico, se observa que los valores obtenidos permanecen menores o iguales a 1, en ambas bebidas por lo que cumplen con este dato.

La fermentación de le leche de almendra también dio como resultado cambios en la apariencia y estructura física de la bebida, esto se puede explicar por la desnaturalización de las proteínas de la almendra a causa de la acción de los microorganismos y según Bernat et al. (2014) eso sucede porque las proteínas presentes en las almendras no muestran una adecuada propiedad de emulsificar los glóbulos de grasa en bebidas elaboradas a partir de almendra, por otro lado, Delgadillo (2019) en su

estudio de elaboración de un producto fermentado a base de leche de almendras y un cultivo probiótico indica que se dio la formación de una red tridimensional de agregados de proteína de almendra en respuesta a la disminución del pH por la formación de ácido láctico, además indica que se dio una reducción de °Brix y de la densidad de la bebida, por lo que estos resultados coinciden con lo obtenido en este estudio para el kéfir de leche de almendra.

De acuerdo con la caracterización microbiológica realizada a nivel micro y macroscópico (Tabla 6), se presume la presencia de tres géneros bacterianos: *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* tanto en el kéfir de leche de soya como en el kéfir de leche de almendra, lo cual según Bourrie et al. (2016) dichos géneros junto con *Leuconostoc* son los que predominan en el kéfir de leche de vaca. En cuanto a los recuentos, para el kéfir de leche de soya a las 24 horas se obtuvo $4,90 \times 10^7$ UFC/mL de BAL y $6,60 \times 10^7$ UFC/mL de hongos y levaduras, mientras que en los recuentos obtenidos por Gamba et al. (2020) se obtuvo 10^9 UFC/mL de LAB y 10^4 UFC/mL de levaduras, a su vez Suriasih et al. (2020) menciona que un alargamiento de los períodos de incubación de 24 a 48 y 72 horas reduce significativamente los recuentos de levaduras en el kéfir debido a la caída del pH del medio, sin embargo en este estudio no se observaron recuentos más bajos de levaduras sino que se observó recuentos de al menos 10^7 UFC/mL tanto para las BAL como para los hongos y levaduras en ambas bebidas y a los diferentes tiempos de fermentación, estas diferencias observadas pueden deberse al origen y calidad de las leches vegetales (Ziarno & Cichońska, 2021), a las condiciones de incubación o por errores cometidos en la técnica empleada para el recuento. Sin embargo, según la FAO (2006) para que un alimento sea considerado como probiótico debe contar con $> 10^6 - 10^8$ UFC/g o $> 10^8 - 10^{10}$ UFC/dosis de células viables, por lo en este estudio tanto el kéfir de leche de soya como el kéfir de leche de almendra elaborado a las 18, 24 y 48 horas de fermentación cumplen con este requisito (Tabla 7), además de cumplir con los criterios de calidad establecidos por la norma INEN 2395 para leches fermentadas lo cual lo hace apto para el consumo. Para ambas bebidas de kéfir, tanto la presencia de los microorganismos probióticos

como las diferencias en las propiedades físico-químicas indican que la leche de soya y la leche de almendra son sustratos adecuados para la fermentación con granos de kéfir, además ya se ha informado de que existe una alta capacidad de supervivencia de la microflora del kéfir en bebidas de origen vegetal (Łopusiewicz et al., 2020).

En cuanto al análisis sensorial, los productos generados por el metabolismo de los microorganismos influyen en los atributos de las bebidas, por ejemplo, el ácido láctico y el etanol alteran las características organolépticas, el acetaldehído y diacetilo contribuyen con el aroma del producto, los polisacáridos contribuyen con la textura y cremosidad (Santos & Vega, 2012).

Uno de los atributos más importantes para determinar la probabilidad de éxito de un producto en el mercado es el sabor (Castro et al., 2016), que en este caso se relaciona directamente con la acidez la cual es proporcionada por la presencia de ácidos orgánicos en el medio y de acuerdo a lo obtenido en este estudio, existe un aumento de ácido láctico a medida aumenta el tiempo de fermentación, lo cual podría influir en el sabor del kéfir (Kesika et al., 2022), sin embargo se determinó mediante una prueba de independencia de Chi-cuadrado que la aceptabilidad general de ambas bebidas son independientes del tiempo de fermentación. Tangyu et al. (2019) menciona que la fermentación puede mejorar el perfil sensorial de las bebidas de origen vegetal, como resultado de sabores volátiles deseables y una disminución a sabores de frijoles debido a la privación de *n*-hexanal y *n*-hexanol, lo que explica la aceptación de ambas bebidas sin un rechazo extremo por parte de los evaluadores. No obstante, se necesitan más estudios para mejorar los puntajes de los atributos ambas bebidas y definir un tiempo ideal de fermentación para su consumo.

Capítulo VI. Conclusiones

- La fermentación con granos de kéfir en la leche de soya y en la leche de almendra a las 18, 24 y 48 horas, cambio la apariencia, color y olor de las leches vegetales y resulto en un aumento estadísticamente significativo del contenido de ácido láctico y una disminución estadísticamente significativa 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 son 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, 24y 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 eran 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.

Capítulo VII. Recomendaciones

- Realizar una comparación entre el comportamiento de los parámetros físico-químicos, microbiológicos y sensoriales de las bebidas 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.

Capítulo VIII. Bibliografía

- Ahmad, A., Hayat, I., Arif, S., Masud, T., Khalid, N., & Ahmed, A. (2014). Mechanisms Involved in the Therapeutic Effects of Soybean (*Glycine Max*). *International Journal of Food Properties*, 17(6), 1332–1354. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.714828>
- Altay, F., Karbancioglu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., & Heperkan, D. (2013). A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.016>
- Aspri, M., Papademas, P., & Tsaltas, D. (2020). Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products. *Fermentation*, 6(1), 30. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010030>
- Azizi, N. F., Kumar, M. R., Yeap, S. K., Abdullah, J. O., Khalid, M., Omar, A. R., Osman, M. A., Mortadza, S. A. S., & Alitheen, N. B. (2021). Kefir and its biological activities. In *Foods* (Vol. 10, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods10061210>
- Barreca, D., Nabavi, S. M., Sureda, A., Rasekhian, M., Raciti, R., Silva, A. S., Annunziata, G., Arnone, A., Tenore, G. C., Süntar, İ., & Mandalari, G. (2020). Almonds (*Prunus Dulcis* Mill. D. A. Webb): A Source of Nutrients and Health-Promoting Compounds. *Nutrients*, 12(3), 672. <https://doi.org/10.3390/nu12030672>
- Baú, T. R., Garcia, S., & Ida, E. I. (2015). Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: Oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(8), 845–850. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1095861>
- Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2019). Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), 686–700. <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
- Bernat, N., Cháfer, M., González-Martínez, C., Rodríguez-García, J., & Chiralt, A. (2014). Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms. *Food Science and Technology International*, 21(2), 145–157. <https://doi.org/10.1177/1082013213518936>
- Bernat, N., Cháfera, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2015). Probiotic fermented almond “milk” as an alternative to cow-milk yoghurt. *International Journal of Food Studies*, 4(2), 201–211. <https://doi.org/10.7455/ijfs/4.2.2015.a8>
- Blandón, L. M., Islan, G. A., Castro, G. R., Nosedá, M. D., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2016). Kefiran-alginate gel microspheres for oral delivery of ciprofloxacin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 706–715. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.078>

- Bourrie, B. C. T., Willing, B. P., & Cotter, P. D. (2016). The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue MAY, p. 647). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00647>
- Castro Ramírez, R. J., Henostroza Torres, J. A., García- Varela, Y., & Torricella-Morales, R. G. (2016). Aplicación y evaluación de pruebas analíticas sensoriales para productos alimenticios de consumo humano. *Revista de Investigaciones de La Universidad Le Cordon Bleu*, 3(2), 47–61. <https://doi.org/10.36955/riulcb.2016v3n2.004>
- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y., & Wang, Z. (2015). Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 43, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.004>
- Craig, W. J., & Fresán, U. (2021). International Analysis of the Nutritional Content and a Review of Health Benefits of Non-Dairy Plant-Based Beverages. *Nutrients*, 13(3), 842. <https://doi.org/10.3390/nu13030842>
- Dadkhah, S., Pourahmad, R., Mazaheri, M., & Moghimi, A. (2011). Kefir production from soymilk. *Annals of Biological Research*, 2(6), 293–299.
- Delgadillo, L. (2019). *Desarrollo de un producto fermentado probiótico no lácteo a base de leche de almendras*.
- Dimidi, E., Cox, S., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, 11(8), 1806. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>
- Farag, M. A., Jomaa, S. A., Abd El-Wahed, A., & R. El-Seedi, H. (2020). The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients*, 12(2), 346. <https://doi.org/10.3390/nu12020346>
- Gamba, R. R., Yamamoto, S., Abdel-Hamid, M., Sasaki, T., Michihata, T., Koyanagi, T., & Enomoto, T. (2020). Chemical, Microbiological, and Functional Characterization of Kefir Produced from Cow's Milk and Soy Milk. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/7019286>
- Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>
- Hati, S., Vij, S., Singh, B. P., & Mandal, S. (2015). β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 216–220. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6743>

- Jenab, A., Roghanian, R., Ghorbani, N., Ghaedi, K., & Emtiazi, G. (2020). The Efficacy of Electrospun PAN/Kefiran Nanofiber and Kefir in Mammalian Cell Culture: Promotion of PC12 Cell Growth, Anti-MCF7 Breast Cancer Cells Activities, and Cytokine Production of PBMC. *International Journal of Nanomedicine, Volume 15*, 717–728. <https://doi.org/10.2147/IJN.S232264>
- Jeske, S., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2018). Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. *Food Research International, 110*, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.045>
- Kalita, S., Khandelwal, S., Madan, J., Pandya, H., Sesikeran, B., & Krishnaswamy, K. (2018). Almonds and Cardiovascular Health: A Review. *Nutrients, 10*(4), 468. <https://doi.org/10.3390/nu10040468>
- Kesika, P., Sivamaruthi, B. S., & Chaiyasut, C. (2022). A review on the functional properties of fermented soymilk. *Food Science and Technology, 42*. <https://doi.org/10.1590/fst.10721>
- Kohyama, K. (2020). Food Texture – Sensory Evaluation and Instrumental Measurement. In *Textural Characteristics of World Foods* (pp. 1–13). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119430902.ch1>
- Lamuel-Raventos, R. M., & Onge, M.-P. st. (2017). Prebiotic nut compounds and human microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57*(14), 3154–3163. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1096763>
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6488-5>
- LeBlanc, J. G., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M. P., de Valdez, G. F., de Giori, G. S., & Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology, 111*(6), 1297–1309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>
- Leite, A. M. de O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology, 44*(2), 341–349. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200001>
- Łopusiewicz, Ł., Drożdżowska, E., Trocer, P., Kwiatkowski, P., Bartkowiak, A., Gefrom, A., & Sienkiewicz, M. (2020). The Effect of Fermentation with Kefir Grains on the Physicochemical and Antioxidant Properties of Beverages from Blue Lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Seeds. *Molecules, 25*(24), 5791. <https://doi.org/10.3390/molecules25245791>
- Magalhães, K. T., de Melo Pereira, G. V., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2011). Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology, 42*(2), 693–702. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200034>

- Magwaza, L. S., & Opara, U. L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products-A review. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 184, pp. 179–192). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.001>
- Mäkinen, O. E., Wanhalinna, V., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2016). Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3), 339–349. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761950>
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 44, pp. 94–102). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Messina, M. (2016). Soy and Health Update: Evaluation of the Clinical and Epidemiologic Literature. *Nutrients*, 8(12), 754. <https://doi.org/10.3390/nu8120754>
- Oliveira, I., Meyer, A. S., Afonso, S., Aires, A., Goufo, P., Trindade, H., & Gonçalves, B. (2019). Phenolic and fatty acid profiles, α -tocopherol and sucrose contents, and antioxidant capacities of understudied Portuguese almond cultivars. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), e12887. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12887>
- Peluzio, M. do C. G., Dias, M. de M. e, Martinez, J. A., & Milagro, F. I. (2021). Kefir and Intestinal Microbiota Modulation: Implications in Human Health. *Frontiers in Nutrition*, 8, 41. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.638740>
- Pendón, M. D., Bengoa, A. A., Iraporda, C., Medrano, M., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2021). Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.15385>
- Plessas, S., Nouska, C., Mantzourani, I., Kourkoutas, Y., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2016). Microbiological Exploration of Different Types of Kefir Grains. *Fermentation*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010001>
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue OCT, p. 1177). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>
- Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*, 48(2), 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.005>
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. D. C. G. (2017). Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. In *Nutrition Research Reviews* (Vol. 30, Issue 1, pp. 82–96). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>

- Santos, A., & Vega, D. (2012). *Estandarización del Proceso de Fermentación de Leche Entera Ultrapasteurizada con Gránulos de Kéfir*. Universidad de El Salvador .
- Scourboutakos, M., Franco-Arellano, B., Murphy, S., Norsen, S., Comelli, E., & L'Abbé, M. (2017). Mismatch between Probiotic Benefits in Trials versus Food Products. *Nutrients*, *9*(4), 400. <https://doi.org/10.3390/nu9040400>
- Sekikawa, A., Ihara, M., Lopez, O., Kakuta, C., Lopresti, B., Higashiyama, A., Aizenstein, H., Chang, Y.-F., Mathis, C., Miyamoto, Y., Kuller, L., & Cui, C. (2018). Effect of S-equol and Soy Isoflavones on Heart and Brain. *Current Cardiology Reviews*, *15*(2), 114–135. <https://doi.org/10.2174/1573403x15666181205104717>
- Sethi, S., Tyagi, S. K., & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 53, Issue 9, pp. 3408–3423). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>
- Severiano-Pérez, P. (2019). ¿Qué es y cómo se utiliza la evaluación sensorial? *INTERdisciplina*, *7*(19), 47. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485705e.2019.19.70287>
- Silva, A. R. A., Silva, M. M. N., & Ribeiro, B. D. (2020). Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. In *Food Research International* (Vol. 131, p. 108972). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>
- Slattery, C., Cotter, P. D., & W. O'Toole, P. (2019). Analysis of Health Benefits Conferred by Lactobacillus Species from Kefir. *Nutrients*, *11*(6), 1252. <https://doi.org/10.3390/nu11061252>
- Suriasih, K., Sucipta, N., Wulan, W., & Wirawan, P. (2020). Chemical Characteristics And Microbiological Kefir Beverages From Bali Cattle During Storage. *International Journal Of Scientific and Technology Research* , *9*(8), 135–138.
- Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C. J., & Wittmann, C. (2019). Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 103, Issues 23–24, pp. 9263–9275). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10175-9>
- Vanga, S. K., & Raghavan, V. (2018). How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 55, Issue 1, pp. 10–20). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2915-y>
- Vieira, C. P., Rosario, A. I. L. S., Lelis, C. A., Rekowsky, B. S. S., Carvalho, A. P. A., Rosário, D. K. A., Elias, T. A., Costa, M. P., Foguel, D., & Conte-Junior, C. A. (2021). Bioactive Compounds from Kefir and Their Potential Benefits on Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2021). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/9081738>
- Vogel, J. T., Liu, W., Olhoft, P., Crafts-Brandner, S. J., Pennycooke, J. C., & Christiansen, N. (2021). Soybean Yield Formation Physiology – A Foundation for Precision Breeding Based Improvement. In

Frontiers in Plant Science (Vol. 12, p. 2483). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.719706>

Wansutha, S., Yuenyaow, L., Jantama, K., & Suvarnakuta, S. (2018). Antioxidant Activities of Almond Milk Fermented with Lactic Acid Bacteria. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)*, 42, 115–119.

World Health Organization: Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006). Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food and Nutrition Paper*, 85, 1–50.

Yan, F., & Polk, D. B. (2020). Probiotics and Probiotic-Derived Functional Factors—Mechanistic Insights Into Applications for Intestinal Homeostasis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11, p. 1428). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01428>

Yang, M., Yang, X., Chen, X., Wang, J., Liao, Z., Wang, L., Zhong, Q., & Fang, X. (2020). Effect of Kefir on Soybean Isoflavone Aglycone Content in Soymilk Kefir. *Frontiers in Nutrition*, 7, 267.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2020.587665>

Zhang, Y. Y., Hughes, J., & Grafenauer, S. (2020). Got Mylk? The Emerging Role of Australian Plant-Based Milk Alternatives as A Cow's Milk Substitute. *Nutrients*, 12(5), 1254.
<https://doi.org/10.3390/nu12051254>

Zhao, D., & Shah, N. P. (2014). Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.029>

Ziarno, M., & Cichońska, P. (2021). Lactic Acid Bacteria-Fermentable Cereal- and Pseudocereal-Based Beverages. *Microorganisms*, 9(12), 2532. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122532>

Capítulo IX. Apéndices