



Estandarización, formulación y evaluación sensorial de una bebida fermentada con granos de kéfir elaborada a partir de leche, suero y soya

Standardization, formulation and sensory evaluation of a beverage fermented with kéfir grains made from milk, whey and soy

Luis Ramiro Chacón-Gurrola.

Docente en Universidad de Estudios Avanzados (UNEA),
Campus Chihuahua.

Recibido: octubre 2019
Aceptado: diciembre 2019

Resumen

Se formuló y estandarizó una bebida láctea fermentada a partir de leche, lactosuero (LS) y soya midiendo el descenso de pH a través del proceso de fermentación. El objetivo del estudio fue formular y estandarizar la elaboración de kéfir a partir de los sustratos mencionados para seleccionar las medidas óptimas de fermentación. Para lo anterior se elaboraron once bebidas variando sus condiciones de incubación y su porcentaje de sustrato. Los parámetros óptimos seleccionados para la elaboración de kéfir fueron: 25 °C de temperatura, en un lapso

Abstract

A fermented milk drink was formulated and standardized from milk, whey (LS) and soybeans by measuring the decrease in pH through the fermentation process. The objective of the study was to formulate and standardize the preparation of kefir from the aforementioned substrates to select the optimal fermentation measures. For the above, eleven drinks were made, varying their incubation conditions and their percentage of substrate. The optimal parameters selected for the production of kefir were: 25 ° C of temperature, in a period of 24



Resumen

de 24 horas a 100 RPM con 15% de inóculo. Los kéfires desarrollados con el sustrato de soya optimizaron el tiempo de fermentación hasta en 50%, lo que pudo deberse al tipo de carbohidratos que contiene. Una vez seleccionados estos parámetros se procedió a efectuar la elaboración de doce tratamientos variando el porcentaje de sustrato. Primero se eliminaron cuatro bebidas por su mal sabor, los ocho restantes fueron sometidas a una prueba de aceptación sensorial con cien panelistas no entrenados, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) resultando más aceptados los procesados con 100% leche, 100% LS y una mezcla de 25% de leche y 75% de LS, descartando de esta manera los efectuados con el sustrato soya.

Palabras clave: Comunidad judía, Kosher, factibilidad, segmentación de mercado, marketing, gastronomía, encuesta.

Abstract

hours at 100 RPM with 15% inoculum. The kefir developed with the soy substrate optimized the fermentation time by up to 50%, which could be due to the type of carbohydrates it contains. Once these parameters had been selected, twelve treatments were made, varying the percentage of substrate. First, four drinks were eliminated due to their bad taste, the remaining eight were subjected to a sensory acceptance test with one hundred untrained panelists, finding significant differences between the treatments ($P < 0.05$), with those processed with 100% milk, 100% being more accepted. LS and a mixture of 25% milk and 75% LS, thus discarding those made with the soy substrate.

Keywords: Kewish community, Kosher, feasibility, market segmentation, marketing, gastronomy, survey.

Introducción

La leche presenta propiedades nutritivas que han sido consideradas como tales desde el comienzo de la humanidad. El avance en áreas como la Bioquímica, la Microbiología y la Biotecnología, entre otras, ha permitido que su aplicación vaya en aumento (Brito, 2009).

La leche es una mezcla compleja de fosfolípidos, proteínas, carbohidratos, minerales, vitaminas, enzimas y diversos compuestos orgánicos. Por su composición química, corre el riesgo de contaminarse por medios como el ambiente, el animal del que proviene, el ordeñador y el equipo empleado en el proceso de extracción (Ibrahim *et al.*, 2005).

El LS es una fuente de proteína de alta calidad económicamente accesible (Luhovyy *et al.*, 2007). 50% del LS producido a nivel mundial es tratado y transformado en productos alimenticios (Panesar *et al.*, 2007). 45% es utilizado en forma líquida, 30% se deshidrata para su uso como polvo y 15% se comercializa como lactosa (Panesar *et al.*, 2007). En países como Nueva Zelanda y Japón, esta materia prima se utiliza en la elaboración de fórmulas lácteas, pastas dentífricas, alimentos nutracéuticos, pomadas antifúngicas y en la industria cosmetológica (Baró *et al.*, 2001).

En México, el LS se emplea en la elaboración de confitería, productos farmacéuticos (Baró *et al.*, 2001), producción de requesón o queso ricotta (Cujano-Guambo, 2016), elaboración de bebidas, fórmulas infantiles y alimentos dietéticos, entre otros (Baró *et al.*, 2001; Wakabayashi *et al.*, 2006). Uno de los usos más comunes del LS es como ingrediente en la producción de bebidas (Baccouche *et al.*, 2013;



Varghese *et al.*, 2014), caracterizándose por proporcionar energía, regular la temperatura del cuerpo, evitar la deshidratación y calmar la sed (Shaikh *et al.*, 2001).

El LS es una fuente barata de proteína, por tanto, la elaboración de bebidas a base de este, a escala comercial, tiene ventajas económicas; a la fecha existen algunas en el mercado (Shaikh *et al.*, 2001). Se ha mencionado, incluso, que esta materia prima altamente nutritiva podría sustituir a la leche (Almeida *et al.*, 2009).

Por otra parte, la soya presenta un consorcio de proteínas, fibra, vitaminas y minerales (Malencic *et al.*, 2007; Xu y Chang, 2007) presentando además una gran variedad de fitoquímicos biológicamente activos como: isoflavonas, coumestrol, fitato, lecitina, fitoesteroles y la vitamina E que proporcionan un potencial benéfico a la salud del consumidor como disminuir el colesterol en la sangre (Tripathi y Misra, 2005) y la incidencia de enfermedades del corazón y el cáncer (Messina *et al.*, 1994; Carroll *et al.*, 1995; Arellano *et al.*, 2008) además de poseer propiedades antioxidantes (Shori, 2013) y ser de bajo costo (Liu *et al.*, 2005).

Este producto es un elemento importante en la dieta y se ha utilizado para la elaboración de productos lácteos fermentados (PLF) como el yogur y el kéfir (Abraham y Antoni, 1999) ofreciendo beneficios nutricionales para la salud, ya que no contiene colesterol, ni lactosa y sólo presenta pequeñas cantidades de ácidos grasos saturados (Dadkhah *et al.*, 2011).

La demanda de alimentos formulados que contienen proteínas de soya, LS y leche se ha traducido en un aumento de nuevos productos con valor nutricional excepcional (Roesch *et al.*, 2004). Existen diversos estudios que demuestran que el consumo de las proteínas de soya e isoflavonas reduce las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y puede proporcionar otros beneficios cardiovasculares (Sirtori *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 1998). Así mismo, el mayor incremento de las lipoproteínas de alta densidad parece estar asociado a la presencia de isoflavonas (Anthony *et al.*, 1998) en el que 25 g/día de proteína de soya reduce las lipoproteínas de baja densidad, el colesterol y los triglicéridos en un 9.2, 12.9 y 10.5%, respectivamente.

De igual forma, el interés de los péptidos bioactivos de las PLS se está incrementando debido a su alto grado de pureza a bajo precio por lo que representa una atractiva búsqueda implicada en la salud (Haque y Chand, 2008). Por esta razón se consideró no sólo la leche como un sustrato para la elaboración del kéfir sino también la soya y el LS por sus efectos benéficos en el organismo. Es por ello que el desarrollo de una bebida fermentada con granos de kéfir utilizando cada uno de estos sustratos potencializaría su beneficio y reducirá su costo.

Los AF ofrecen propiedades biológicas y terapéuticas que van más allá de su valor nutricional básico, estos se incorporan en la dieta con el fin de reducir el riesgo de algunas enfermedades (Shori, 2013). Presentan actividad relacionada con una o varias funciones del organismo cuyas acciones positivas justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable (Shori, 2013).

Los metabolitos obtenidos tras la fermentación propician que algunos productos que se someten a este proceso sean considerados alimentos funcionales (Rodríguez *et al.*, 2003). La fermentación es la forma más antigua de conservar alimentos cuando al mismo tiempo se mejora su contenido nutricional (Marsh *et al.*, 2014). La fermentación resulta de la acidificación de la leche a través de la acción de las bacterias



ácido lácticas (BAL) que transforman la lactosa en ácido láctico, lo que provoca importantes cambios fisicoquímicos, sensoriales y microbiológicos (Casarotti *et al.*, 2014).

Existen diferentes tipos de fermentaciones, siendo las más conocidas la alcohólica, en la que se degradan azúcares en alcohol y CO_2 ; y la fermentación láctica producida por las BAL dando lugar a metabolitos como CO_2 , ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, etc. (Vázquez y Dacosta, 2007).

En muchas regiones del mundo las bebidas fermentadas se han dado a conocer por sus atributos ya que promueven la salud previendo ser un componente importante dentro del mercado de los alimentos funcionales. Existen pruebas de que el kombucha, una bebida fermentada con ligero sabor ácido, obtenida a base de té endulzado, surgió aproximadamente 220 a. C. mientras que en estudios recientes se ha demostrado que el kéfir fue fermentado hace 3500 años en Asia (Marsh *et al.*, 2014). Estos productos son ampliamente producidos, en ellos la formación del gel es uno de los atributos de mayor importancia. Este gel se obtiene según la composición química, el contenido de materia seca, temperatura, homogenización, incubación, temperatura de enfriamiento y tiempo de almacenamiento (Bensmira *et al.*, 2010).

Los PLF son considerados como alimentos funcionales debido a que las BAL utilizadas para su elaboración propician que el producto final suministre valores terapéuticos significativos, y tienen la capacidad de producir diversos metabolitos que poseen funciones como: actividad antimicrobiana, ayudar a reducir el colesterol sérico, aliviar la intolerancia a la lactosa, estimular el sistema inmunológico y estabilizar la microflora intestinal (Shori, 2013), además de reducir los niveles de colesterol en la sangre, actuando como alternativa para mejorar la digestión de lactosa.

Por otra parte, la enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una de las principales moléculas responsables de la reducción del colesterol en la sangre y, por tanto, la inhibición de esta enzima resulta en una disminución de la presión arterial (Quirós *et al.*, 2005; Escudero *et al.*, 2012). Se han reportado que PLF cultivados con diferentes cepas de BAL presentan efectos antihipertensivos (Quirós *et al.*, 2005).

El kéfir es fabricado por la fermentación del sustrato con granos de kéfir por una compleja mezcla simbiótica microbiana de bacterias *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, y levaduras *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Saccharomyces* (Miguel *et al.*, 2010), incrustado en un polisacárido que se compone de glucosa y galactosa (Paraskevopoulou *et al.*, 2003). Sin embargo, algunos factores como la proporción de grano en la leche, la incubación, la agitación y las condiciones de almacenamiento pueden influir en las características microbiológicas y químicas del producto final (Leite *et al.*, 2013).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue formular y estandarizar la elaboración de kéfir a partir de los sustratos antes mencionados con la finalidad de seleccionar sus medidas óptimas de fermentación.

Desarrollo

Materiales y métodos

Localización del área de estudio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología de Productos de Origen Animal en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, localizada en Periférico Francisco R. Almada, kilómetro 1, Chihuahua, Chihuahua, México.



La leche fue obtenida de la ordeña de vacas “Holstein”, ubicadas en la misma Universidad. Su alimentación consistió de alfalfa, ensilaje de sorgo forrajero y concentrado balanceado (maíz rolado, pasta de soya, harinolina, melaza, premezcla de minerales) cuatro veces al día. El concentrado se les ofreció después de cada ordeño (cada doce horas).

Diseño del experimento

El desarrollo experimental para la formulación y la estandarización del kéfir utilizando como sustrato: leche, LS y soya. Inicio del experimento a partir de 12 tratamientos (cuadro 1).

Estandarización del kéfir

La estandarización del kéfir se desarrolló con el fin de seleccionar las condiciones de fermentación adecuadas respecto al porcentaje de inóculo y tiempo, observando el descenso de pH durante el proceso de fermentación. Se efectuaron 11 diferentes bebidas en las que se varió el porcentaje de sustrato e inóculo. La temperatura de incubación fue de 25 °C según lo reportado por Dadkhah *et al.* (2011) y el tiempo fue de 24 horas o hasta alcanzar un pH de 4.2 a 4.6 (Magalhães *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Tratamientos iniciales para el desarrollo del kéfir.

Tratamientos	Sustrato		
	Leche (L) (%)	Soya (S) (%)	Lactosuero (LS) (%)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	75	25	0
5	50	50	0
6	25	75	0
7	0	25	75
8	0	50	50
9	0	75	25
10	75	0	25
11	50	0	50
12	25	0	75

*T1=Cont leche T2=Cont LS, T3=Cont 25L-75LS T4=Lferm T5= LS ferm T6=L-LS ferm T7= L ferm con US T8= LS ferm con US T9= L-LS ferm con US T10=75L-25 LS T11=50L-50LS y T12=25L-75LS2.

El cuadro 3 muestra cada una de las bebidas de kéfir que se realizaron y sus diferentes condiciones de incubación, el objetivo de este paso fue elegir la de mejor agrado en cuanto a sabor. Una vez desarrolladas las 11 bebidas, y con base en el sabor, se establecieron los parámetros de fermentación seleccionando el porcentaje de inóculo al 15%, con una temperatura de 25 °C y por 24 horas de incubación a 100 RPM. Posteriormente se desarrollaron los 12 tratamientos iniciales (cuadro 2) descartando los tratamientos 5, 6, 7 y 8 (por el sabor no característico del kéfir) mientras que los restantes (cuadro 4) fueron sometidos a un análisis de aceptación sensorial.



Proceso de elaboración del kéfir

Pasteurización

La pasteurización se llevó a cabo con base en lo reportado por Jeličić *et al.* (2012), de 63 a 65 °C por 30 minutos, monitoreándose la temperatura con un termómetro digital modelo THDP-450 (Update International, E.U.A.).

Kéfir de leche

Los granos de kéfir en este estudio fueron obtenidos de una familia tradicional en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México. La leche fue pasteurizada a 63-65 °C durante 30 min., posteriormente se enfrió a 25 °C, lavando el grano con agua destilada según lo reportado por Dadkhah *et al.*, (2011). A continuación se incubó en un biorreactor de 5 litros (Applikon® Biotechnology, Inc, Holanda) utilizando las condiciones anteriormente descritas (Guzel-Seydim *et al.*, 2000). Los granos fueron separados de la fermentación de la leche mediante un filtrado a través de un colador (Dadkhah *et al.*, 2011). Finalmente, el kéfir fue refrigerado a 4 °C para realizar la evaluación sensorial.

Cuadro 2. Fermentaciones efectuadas para estandarizar el kéfir.

Tx	Leche (%)	Suero (%)	Soya orgánica (%)	Soya comercial (%)	Inóculo (%)	Temp. (°C)	Tiempo (h)
1	100	-	-	-	5	25	24
2	100	-	-	-	10	25	23
3	100	-	-	-	15	25	24
4	100	-	-	-	30	25	24
5	-	-	-	100	5	25	14
6	-	-	100	-	5	25	12
7	-	-	-	100	10	25	12
8	-	100	-	-	5	25	20
9	50	-	50	-	5	25	23
10	25	75	-	-	5	25	20
11	-	25	75	-	5	25	14

*T1=Cont leche T2=Cont LS, T3=Cont 25L-75LS T4=Lferm T5= LS ferm T6=L-LS ferm T7= L ferm con US T8= LS ferm con US T9= L-LS ferm con US T10=75L-25 LS T11=50L-50LS y T12=25L-75LS.

Cuadro 3. Tratamientos sometidos al análisis sensorial.

Tratamientos	Sustrato		
	Leche (L) (%)	Soya (S) (%)	Lactosuero (LS) (%)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	75	25	0
9	0	75	25
10	75	0	25
11	50	0	50
12	25	0	75

*T1=Cont leche T2=Cont LS, T3=Cont 25L-75LS T4=Lferm T5= LS ferm T6=L-LS ferm T7= L ferm con US T8= LS ferm con US T9= L-LS ferm con US T10=75L-25 LS T11=50L-50LS y T12=25L-75LS.

Kéfir de soya

Para la elaboración de la bebida a base de soya se pesaron 40 g del grano, se limpiaron de impurezas y se lavaron con agua destilada, colocando en remojo alcalino de 6 a 12 horas con una solución de NaHCO₃ a 0.5% (Promesa, Productos Mexicanos, México); la operación de blanqueo tuvo la finalidad de eliminar la lipoxigenasa (Nikzade *et al.*, 2008). Posterior al remojo se obtuvo un peso de 60 g y se colocó en el equipo Soy Milk Maker Tribest Soyabella SB-130 (Soymilk maker, USA) agregando agua a razón de 1 l por cada 60 g de grano hidratado pasando el producto por un tamiz que el mismo equipo aportaba, obteniendo la bebida de soya que se sometió a cocción hasta alcanzar una temperatura de 82 °C, finalmente se enfrió hasta llegar a temperatura ambiente (Nikzade *et al.*, 2008). Para la elaboración del kéfir de soya se procedió igual que en el kéfir de leche.

Kéfir de lactosuero

El manejo de la leche destinada a la preparación de los distintos kéfires de suero después de evaluar sus atributos de calidad consistió en: filtración (con una tela tipo manta) para eliminar materia extraña, pasteurización (63 ± 1 °C, 30 min.), enfriamiento (45 ± 1 °C), adición de cloruro de calcio 0.15 g·lt⁻¹ (Fermont, México), adición de renina 0.15 mL·lt⁻¹. Cuamix, (Christian and Hansen, México).

Después de un tiempo de coagulación de aproximadamente 60 min., la cuajada se cortó en cubos de 1 cm³ con cuchillos de acero inoxidable y se agitó lentamente durante 5 min. para promover el desuerado y favorecer la formación de granos de cuajada más pequeños y uniformes en tamaño. El grano de la cuajada se dejó reposar durante 15 min. más para favorecer la separación del suero; transcurrido este tiempo se eliminó cerca de 85% del suero, este último se enfrió a 25 °C y se procedió de la misma manera para la elaboración del kéfir de leche.

Análisis sensorial

Los tratamientos se evaluaron con un panel no entrenado de 100 individuos, de diferente ámbito profesional, de entre 17 y 40 años de edad (Anzaldúa-Morales, 2005). La evaluación se llevó a cabo en el laboratorio de análisis sensorial ubicado en la Facultad de Zootecnia y Ecología.

El estudio se efectuó en compartimentos individuales con el propósito de no ejercer ningún tipo de influencia sobre el resto de los panelistas, realizándose en un lugar tranquilo y con buena iluminación, asegurándose que los participantes se enjuagaran la boca con agua después de cada captación (Acevedo *et al.*, 2009).

Del total de los participantes, se tomó en cuenta que consumieran PLF y se descartó a los fumadores e intolerantes a la lactosa. El análisis se dividió en dos sesiones evaluando cuatro tratamientos en la primera sesión y el resto en la siguiente.

Las muestras de kéfir se presentaron a una temperatura de 4 °C, y en un volumen de 10 mL por muestra, evaluándolas de izquierda a derecha, las pruebas se evaluaron de 9 de la mañana a 12 del día, utilizando una escala hedónica de cinco puntos que iba de "me gusta mucho" a "me disgusta mucho" (apéndice 1) (Castañeda *et al.*, 2009).

Descripción para elegir los tratamientos finales

Una vez seleccionadas las condiciones de fermentación se procedió a elaborar los 12 tratamientos iniciales descritos con anterioridad, de los cuales se eliminaron los kéfires 5, 6, 7 y 8 por presentar un



sabor no característico del kéfir, mientras que los ocho restantes fueron sometidos a una evaluación sensorial con el fin de elegir los tres de mayor aceptación, como se muestra en la figura 1.

Análisis estadístico

Los resultados del análisis sensorial se realizaron con una prueba de Chi cuadrada de Person, usando la instrucción CHISQ MEASURES. Tomando en cuenta los siguientes parámetros:

Ho: $T_1=T_2=T_3=T_4=T_5=T_6=T_7=T_8$ Ha: por lo menos un T_i es diferente de $1/8$

Donde: T_i = probabilidad de que el panelista elija la bebida i en el caso de $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ y 8 . Con el estadístico de prueba chi-cuadrada como:

$$X^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde:

X^2 = Valor calculado de chi-cuadrada.

O_i = Valor observado (elegido por cada panelista).

$E_i = np_i$ = Valores esperados en igual proporción para cada kéfir.

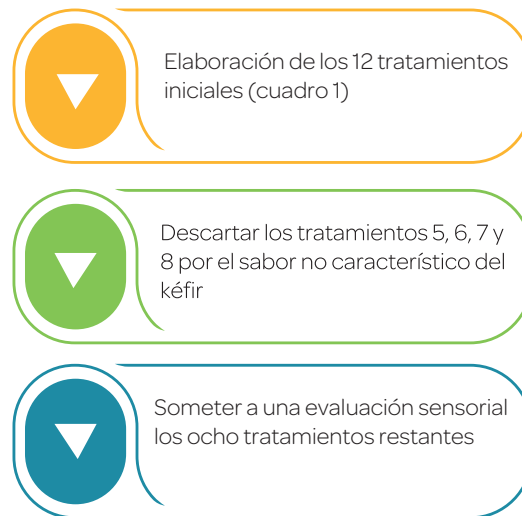


Figura 1. Diagrama de flujo para seleccionar los tratamientos finales concurrentes a cada uno de los estudios.

Resultados y discusión

Estandarización del kéfir

Previo al desarrollo experimental, fue necesario estandarizar la elaboración de kéfir para establecer las condiciones óptimas de fermentación; según Dadkhah *et al.* (2011), a una temperatura de incubación de 25 °C se presenta la mayor producción de biomasa y se disminuye el tiempo de fermentación a un pH óptimo característico de los PLF. No obstante, diversos autores mencionan que a temperaturas más altas se obtienen fermentaciones en tiempos más cortos, esto se debe a que las BAL en la fase de latencia pueden tardar menos en llegar a un pH de 4.2 a 4.6 debido a que los microorganismos invirtieron menor cantidad de tiempo en adecuar su metabolismo a esa temperatura.

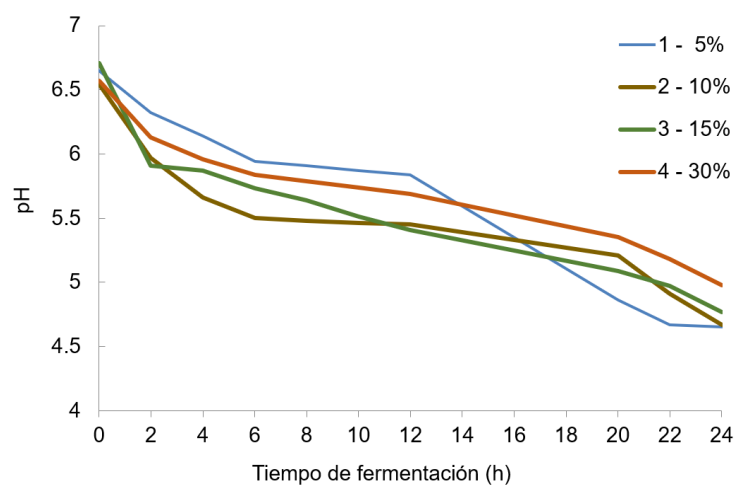
Sin embargo, al utilizar una temperatura de incubación de 25 °C se favorece el sabor del producto final (Dadkhah *et al.*, 2011). Además, Magalhães *et al.*, (2011) mencionan que a 25 °C el número de *Lactobacillus*

homofermentativos se ven favorecidos en comparación con temperaturas de entre 18 y 20 °C y por ende al utilizar temperaturas mayores se obtiene un pH más bajo del esperado, inhibiendo el crecimiento del resto de los microorganismos que se encuentran presentes en el grano de kéfir, ocasionando que no se cumpla con el conteo necesario de BAL para que un alimento sea considerado probiótico. Asimismo, se ha reportado que a una incubación mayor a 25 °C se puede solubilizar mayor cantidad de kéfirán disminuyendo así el peso final del gránulo (Santos y Vega, 2012).

En la gráfica 1 se muestran los valores de pH, a través del tiempo, de kéfir de leche inoculado con diferente porcentaje. En la gráfica se puede observar que a medida que aumenta el porcentaje de inóculo, la velocidad de fermentación se incrementa en las primeras 12 h de incubación y, por tanto, la disminución del pH se acelera, presentando valores similares en las últimas 4 horas, por lo que es de suma importancia tener controlado el pH de tal manera que sea óptimo en la bebida terminada (4.2 a 4.6) (Urribarri *et al.*, 2004).

Cui *et al.* (2013) realizaron una investigación con el propósito de indagar en las condiciones de fermentación para elaborar una bebida fermentada deduciendo que el tiempo de fermentación tiene un efecto pronunciado sobre la calidad de la bebida, seguido de la temperatura, la concentración de carbohidratos y el porcentaje de inóculo.

De igual manera se han realizado diversos estudios enfocados a la optimización de la elaboración de kéfir; Dimitreli y Antoniou (2011) estudiaron el efecto de la temperatura de incubación (30, 25 y 20 °C) en el pH y la viscosidad, demostrando que el tiempo necesario para que el pH alcance el valor óptimo de 4.4 aumenta a medida que se reduce la temperatura de incubación. Las muestras de kéfir a 25 °C mostraron los valores más altos de viscosidad. Los resultados de dicho estudio revelaron que los principales factores que afectan las propiedades reológicas del kéfir son la composición química de la leche, el cultivo iniciador, la temperatura de incubación y el tratamiento térmico. También Bensmira y Jiang (2012) encontraron resultados similares a los reportados por Dimitreli y Antoniou (2011).



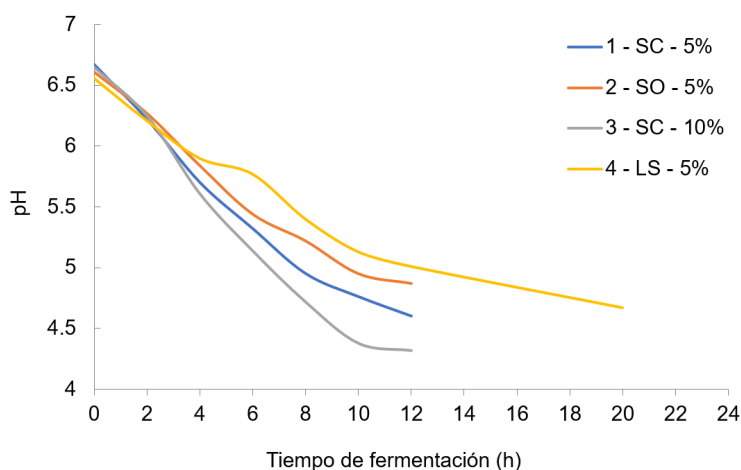
Gráfica 1. pH del kéfir de leche con diferente porcentaje de inóculo a través del tiempo de fermentación (1 - 5%, 2 - 10%, 3 - 15%, 4 - 30%).



En el caso del kéfir para el presente estudio, elaborado con el sustrato de leche, las BAL consumen los nutrientes presentes, principalmente la lactosa, generando además del ácido láctico pequeñas cantidades de ácido acético y dióxido de carbono, capaces de transformar 85% de la fuente de carbono suministrada en ácido láctico ya que al estudiarse el efecto del grano de kéfir no sólo se estaría trabajando con un solo tipo de fermentación sino con una múltiple debido a las bacterias homo y heterolácticas y a la fermentación alcohólica por las levaduras presentes (Urribarri *et al.*, 2004) alcanzando el pH deseado a las 24 horas de fermentación, siendo este el tiempo óptimo para obtener un kéfir de buen sabor.

Los datos obtenidos para el kéfir de leche son similares a los reportados por Leite *et al.* (2013) los cuales obtuvieron un pH de 4.85 a la hora 24 con un porcentaje de inóculo de 3%, utilizando la misma temperatura de este estudio. Por otro lado, Motaghi *et al.* (1997) con un inóculo de 5% adquirieron un pH de 3.89 al mismo tiempo de fermentación, muy por debajo de los resultados de este proyecto y de los reportados por Leite *et al.* (2013), esto puede ser debido al origen y la viabilidad de los granos de kéfir adquiridos.

En la gráfica 2 se aprecia que el kéfir elaborado con una bebida a base de soya optimizó el tiempo de fermentación hasta en 50% en comparación con los efectuados con leche (gráfica 1) y LS. El kéfir alcanzó un pH de 4.2 a 4.6 a la hora 12 de fermentación sin presentar diferencias por el tipo de grano de soya o del porcentaje de inóculo de 5 y 10%. Esto se debe a que la fuente de carbono, por el cual los microorganismos se alimentan, es diferente según los azúcares de cada sustrato. La leche y el LS contienen lactosa (Dragone *et al.*, 2009), la soya contiene α -galactosacaridos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) (Badui, 2013), ésta última al presentar una variedad de fuente de azúcares. Se cree que los microorganismos metabolizan a una velocidad más eficaz, terminando el proceso de fermentación en menor tiempo (12 h). No obstante, Dadkhah *et al.* (2011) reportaron alcanzar el tiempo óptimo de fermentación para adquirir un pH de entre 4.2 a 4.6 con un porcentaje de inóculo de 2, 3 y 4% a 22-25 °C, de 24 h, siendo más cortos los tiempos óptimos que se obtuvieron en este estudio.



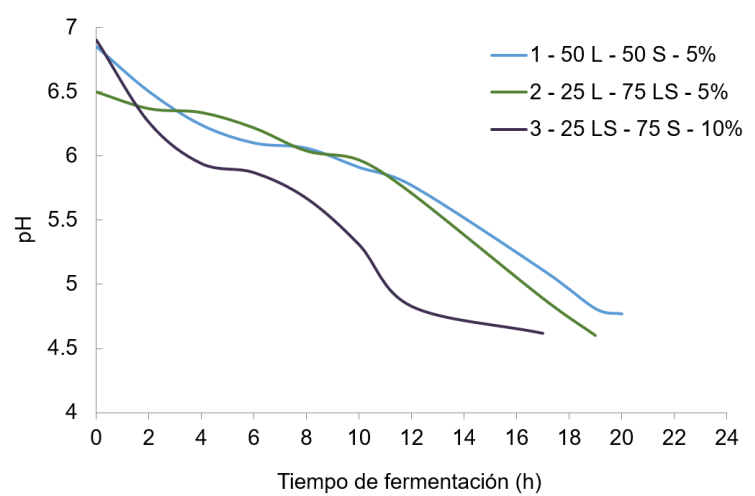
Gráfica 2. Valores de pH de kéfir elaborado con lactosuero y soya y con diferentes porcentajes de inóculo a través del tiempo de fermentación (1 - soya comercial, 2 - soya orgánica, 3 - soya comercial, 4 - lactosuero).

Diversos autores reportan que la elaboración de PLF utilizando una mezcla de diferentes sustratos puede aportar más y mejores efectos benéficos para el que los consume debido a que posee una doble contribución por parte del sustrato.

González y González (2002) desarrollaron una mezcla de LS-leche en diferentes porcentajes, sometiendo estas mezclas a un análisis sensorial, siendo más aceptada la mezcla 50% leche-50% LS, en comparación con la que presenta sólo LS.

La gráfica 3 muestra los valores de pH, a través del tiempo de fermentación, con una combinación de los diferentes sustratos esperando que la fermentación fuera aún más efectiva, debido a que aumenta la fuente de carbono de las BAL y de las levaduras. Sin embargo, en este estudio el pH óptimo fue dado entre la hora 19 y 20, representando solamente 16% de optimización en comparación con el kéfir de leche o LS, independientemente de si la mezcla fue de soya-leche, leche-LS o LS-soya.

El propósito de los ensayos anteriores fue seleccionar las condiciones óptimas de fermentación para elaborar kéfir a partir de diferentes sustratos. Por tanto, los parámetros de fermentación para efectuar el análisis sensorial con base en la estandarización del kéfir fueron: 25 °C de temperatura, durante 24 horas de incubación, con una adición de 15% de inóculo a 100 RPM en condiciones anaerobias.



Gráfica 3. Valores de pH en el kéfir elaborado con una mezcla leche-soya y suero-leche de a través del proceso de fermentación (1- 50-50% leche-soya, 2- 25/75 leche-suero, 3- 25/75 lactosuero-soya).

Evaluación sensorial

La evaluación sensorial es el análisis de los alimentos u otros materiales por medio de los sentidos (Anzaldúa-Morales, 2005). Este proceso es efectuado desde la infancia y conlleva aceptar o rechazar los alimentos de acuerdo a las percepciones experimentales al ingerir u observar un determinado alimento. Este análisis es de suma importancia ya que ayuda a mejorar el control y la calidad de los alimentos (Sancho, 2002).

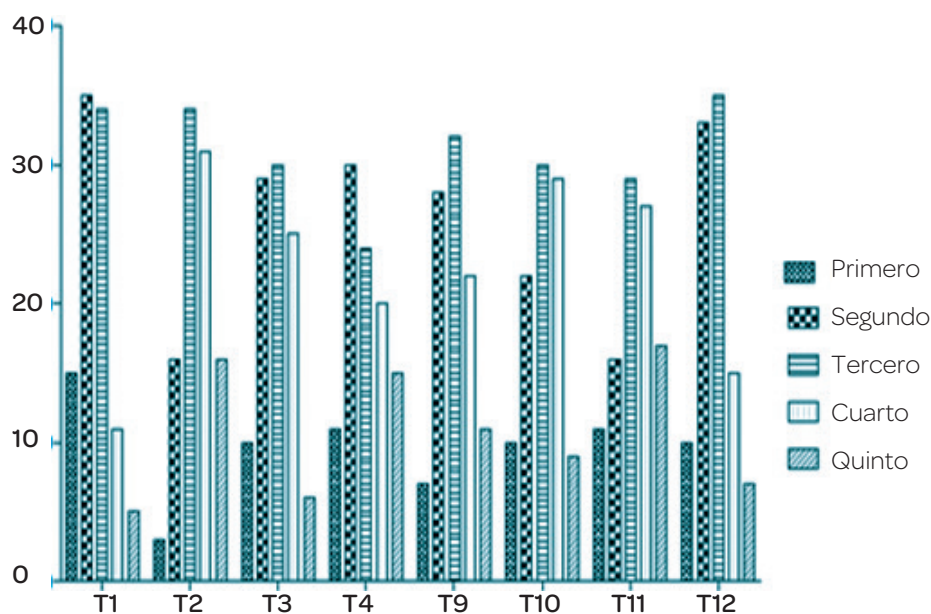
La gráfica 4 muestra la frecuencia en la que los panelistas evaluaron el producto en una escala hedónica del 1 al 5 donde: 1 era me gusta mucho, 2 me gusta moderadamente, 3 ni me gusta ni me disgusta, 4 me disgusta moderadamente, y 5 me disgusta mucho. Se encontraron diferencias estadísticas entre



los tratamientos ($P < 0.05$), poniendo de manifiesto que los tratamientos 1, 3 y 12 fueron los de mayor agrado.

Una vez seleccionados los tratamientos de mayor aceptación se efectuaron los estudios II y III. Cabe mencionar que aunque el tiempo idóneo de fermentación fue de 24 horas, uno de los objetivos de este estudio era analizar el crecimiento de los microorganismos en sus cuatro etapas y por ello que se tomó la decisión de prolongar el tiempo de fermentación a 48 horas con el fin de poder observar en su totalidad el crecimiento de las BAL y las levaduras.

Así mismo, y con base en la evaluación sensorial, se descartaron los tratamientos que contenían el sustrato soya, ya que no fue aceptado por los consumidores. Por lo que el resto de los estudios se realizaron con los sustratos de leche a 100%, LS a 100 % y una mezcla de 25% de leche y 75% de LS.



Gráfica 4. Aceptación del kéfir.

Conclusiones

Se lograron establecer los parámetros de fermentación adecuados para la elaboración del kéfir a partir de diferentes sustratos.

Los granos tибicos se pueden utilizar para fermentar leche, LS y soya con los que el kéfir elaborado con el sustrato de soya adquirió su pH óptimo en menor período que los de leche y el LS pero no el mejor sabor, representando el tiempo y porcentaje de inóculo dos de los factores más pronunciados sobre la calidad de la bebida.

Las condiciones óptimas de fermentación sugeridas son las siguientes: 25 °C de temperatura de incubación en un tiempo de 24 horas, con un porcentaje de inóculo de 15% a 100 RPM.

Al utilizar leche, LS y soya para su fermentación se obtuvieron valores de pH apropiados según la preferencia de los consumidores en que los kéfires desarrollados con 100% leche, 100% LS y 75% LS-25% leche representan las bebidas de mayor agrado por los panelistas.

El sustrato de soya fue descartado, desarrollándose nuevos tratamientos de investigación: 3 como control (sustrato solo), 3 fermentados y 3 incubados con grano de kéfir y aplicación de US.

La leche se puede usar como materia prima en la formulación de una bebida probiótica dirigida a consumidores vegetarianos, alérgicos y/o intolerantes a productos lácteos o al público en general que desea mantener un estado de bienestar.

Bibliografía y referencias

- Abraham, A. G. y De Antoni, G. L. (1999). Characterization of kefir grains grown in cows milk and in soya milk. *The Journal of dairy research*, 66(2):327-333.
- Acevedo, I., García, O., Contreras, J. y Acevedo, E. I. (2009). Elaboración y evaluación de las características sensoriales de un yogurt de leche caprina con jalea semifluida de piña. *Revista UDO Agrícola*, 9(2):442-448.
- Almeida, K. E., Tamime, A. Y. y Oliveira, M. N. (2009). Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 42,(2):672-678.
- Anderson, J. W., Johnstone, B. y Cook, M. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *New England Journal of Medicine*, 333(5):276-282.
- Anthony, M. S., Clarkson, T. B. y Williams, J. K. (1998). Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6):1390S-1393S.
- Anzaldúa-Morales, A. (2005). *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. España: Editorial Acriba.
- Arellano, A. L., García, R. y López Díaz, J. A. (2008). Evaluación del efecto hipocolesterolemizante de productos de soya. *Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ*, 6:165-171.
- Baccouche, A., Ennouri, M. Felfoul, I. y Attia, H. (2013). A physical stability study of whey-based prickly pear beverages. *Food Hydrocolloids*, 33(2):234-244.
- Badui, S. (2013). *Química de los alimentos*. México: Pearson Educación.
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A. y Bouza, J. J. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica*, 42(3-4):135-145.
- Bensmira, M., Nsabimana, C. y Jiang, B. (2010). Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. *LWT-Food Science and Technology*, 43(8):1180-1184.



- Brito, C. (2009). Revaloración de la funcionalidad fisiológica de la leche y los lácteos. *Estudios de optimización. Agro sur*, 37(2):71-80.
- Carroll, K. K. y Kurowska, E. M. (1995). Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *The Journal of nutrition*, 125(suppl_3):594S-597S.
- Casarotti, S. N., Monteiro, D. A., Moretti, M. M. y Penna, A. L. B. (2014). Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International*, 59:67-75.
- Castañeda, B., Manrique, R., Gamarra, F., Jáuregui, A. M. y Ramos, F. (2009). Formulación y elaboración preliminar de un yogurt mediante sustitución parcial con harina de tarwi ("Lupinus mutabilis sweet"). *Medicina naturista*, 3(1):5-12.
- Cui, X. H., Chen, S. J., Wang, Y. y Han, J. R. (2013). Fermentation conditions of walnut milk beverage inoculated with kefir grains. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1):349-352.
- Cujano-Guambo, D. C. (2016). *Determinación de la temperatura y tiempo adecuado para la obtención de requesón deshidratado*. (Tesis inédita de Licenciatura). Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Dadkhah, S., Pourahmad, R., Assadi, M. M. y Moghimi, A. (2011). Kefir production from soymilk. *Annals of Biological Research*, 2(6):293-299.
- Dimitreli, G. y Antoniou, K. D. (2011). Effect of incubation temperature and caseinates on the rheological behaviour of Kefir. *Procedia Food Science*, 1, 583-588.
- Dragone, G., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M. y Teixeira, J. A. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, 112(4):929-935.
- Escudero, E., Aristoy, M. C., Nishimura, H., Arihara, K. y Toldrá, F. (2012). Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Science*, 91(3):306-311.
- González, H. X. y González, R. J. (2002). *Utilización del suero de leche para la elaboración de una bebida fermentada*. (Tesis inédita de Licenciatura). Universidad EARTH, Guácimo, Costa Rica.
- Güzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K. y Bodine, A. B. (2000). Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food composition and Analysis*, 13(1):35-43.
- Haque, E. y Chand, R. (2008). Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *European Food Research and Technology*, 227(1):7-15.



- Ibrahim, A., El-Gawad, A. B., El-Sayed, E. M., Hafez, S. A., El-Zeini, H. M. y Saleh, F. A. (2005). The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *International Dairy Journal*, 15(1):37-44.
- Jeličić, I., Božanić, R., Brnčić, M. y Tripalo, B. (2012). Influence and comparison of thermal, ultrasonic and thermo-sonic treatments on microbiological quality and sensory properties of rennet cheese whey. *Mljekarstvo: časopis za unaprijedenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 62(3):165-178.
- Leite, A. M. O., Leite, D. C. A., Del Águila, E. M., Álvares, T. S., Peixoto, R. S., Miguel, M. A. L. y Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of dairy science*, 96(7):4149-4159.
- Liu, J. R., Chen, M. J. y Lin, C. W. (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(7):2467-2474.
- Luhovyy, B. L., Akhavan, T. y Anderson, G. H. (2007). Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(6):704S-712S.
- Magalhães, K. T., Dragone, G., De Melo Pereira, G. V., Oliveira, J. M., Domingues, L., Teixeira, J. A., Almeida, J. B. y Schwan, R. F. (2011). Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chem*, 126:249-253.
- Malenčić, D., Popović, M. y Miladinović, J. (2007). Phenolic content and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. *Molecules*, 12(3):576-581.
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P. y Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2):113-124.
- Messina, M. J., Persky, V., Setchell, K. D. y Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutrition and cancer*, 21(2):113-131.
- Miguel, M. G. D. C. P., Cardoso, P. G., de Assis Lago, L. y Schwan, R. F. (2010). Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International*, 43(5):1523-1528.
- Motaghi, M., Mazaheri, M., Moazami, N., Farkhondeh, A., Fooladi, M. H. y Goltapeh, E. M. (1997). Kefir production in Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(5):579-581.
- Nagata, C., Takatsuka, N., Kurisu, Y. y Shimizu, H. (1998). Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women. *The Journal of nutrition*, 128(2):209-213.



- Nikzade, V., Tehrani, M. M. y Saadatmand-Tarzjan, M. (2012). Optimization of low-cholesterol-low-fat mayonnaise formulation: Effect of using soy milk and some stabilizer by a mixture design approach. *Food Hydrocolloids*, 28(2):344-352.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N. y Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food chemistry*, 105(1):1-14.
- Paraskevopoulou, A., Athanasiadis, I., Blekas, G., Koutinas, A. A., Kanellaki, M. y Kiosseoglou, V. (2003). Influence of polysaccharide addition on stability of a cheese whey kefir-milk mixture. *Food hydrocolloids*, 17(5):615-620.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L. y Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of dairy science*, 88(10):3480-3487.
- Rodríguez S., Monereo, S. M. y Molina, B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima ¿cerca o lejos? *Revista española de salud pública*, 77(3):317-331.
- Roesch, R., Juneja, M., Monagle, C. y Corredig, M. (2004). Aggregation of soy/milk mixes during acidification. *Food Research International*, 37(3):209-215.
- Sancho, J. (2002). *Introducción al análisis sensorial de los alimentos*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Santos Rosa, A. G. y Vega Romero, D. S. (2012). *Estandarización del proceso de fermentación de leche entera ultrapasteurizada con gránulos de kéfir*. (Tesis inédita de Licenciatura). Facultad de Farmacia y Química, Universidad de El Salvador, San Salvador.
- Shaikh, S. Y., Rathi, S. D., Pawar, V. D. y Agarkar, B. S. (2001). Studies on development of a process for preparation of fermented carbonated whey beverage. *Journal of food science and technology (Mysore)*, 38(5):519-521.
- Shori, A. B. (2013). Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk. *Journal of Taibah University for Science*, 7(4):202-208.
- Sirtori, C. R., Lovati, M. R., Manzoni, C., Monetti, M., Pazzucconi, F. y Gatti, E. (1995). Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *The Journal of nutrition*, 125(suppl_3):598S-605S.
- Tripathi, A. K. y Misra, A. K. (2005). Soybean-a consummate functional food: A review. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 42(2):111-119.
- Urribarrí, L., Vielma, A., Páez, G., Ferrer, J., Mármol, Z. y Ramones, E. (2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica*, 1(1), 0.



- Varghese, K. S., Radhakrishna, K. y Bawa, A. S. (2014). Moisture sorption characteristics of freeze dried whey-grape beverage mix. *Journal of food science and technology*, 51(10):2734-2740.
- Vázquez, H. J. y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 8(4):249-259.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K. y Takase, M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16(11):1241-1251.
- Xu, B. J. y Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of food science*, 72(2):S159-S166.

