

**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS  
AGRARIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
AGROINDUSTRIAL**

***CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE CULTIVO DE YOGURT  
Y FERMENTO DE CHICHA ARTESANAL, EN LA  
ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA  
TIPO KEFIR, A NIVEL DE LABORATORIO.***

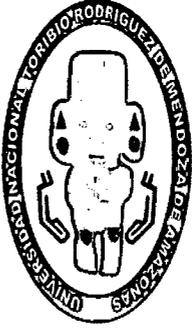
**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**AUTORES : Br. ALEX RIVERA VILLACREZ  
Br. ADLER ELIO ROJAS MUÑOZ**

**ASESOR : Dra. FLOR GARCÍA HUAMÁN**

**CHACHAPOYAS - PERÚ**

**2011**



**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS  
AGRARIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
AGROINDUSTRIAL**

***CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE CULTIVO DE YOGURT Y  
FERMENTO DE CHICHA ARTESANAL, EN LA ELABORACIÓN DE  
UNA BEBIDA FERMENTADA TIPO KEFIR, A NIVEL DE  
LABORATORIO.***

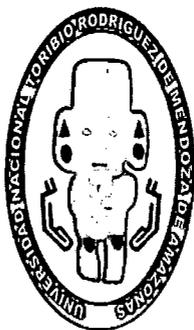
**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
AGROINDUSTRIAL**

**AUTORES : Br. ALEX RIVERA VILLACREZ  
Br. ADLER ELIO ROJAS MUÑOZ**

**ASESOR : Dra. FLOR GARCÍA HUAMÁN**

**CHACHAPOYAS - PERÚ**

**2011**



**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
AGROINDUSTRIAL**

***CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE CULTIVO DE YOGURT Y  
FERMENTO DE CHICHA ARTESANAL, EN LA ELABORACIÓN DE  
UNA BEBIDA FERMENTADA TIPO KEFIR, A NIVEL DE  
LABORATORIO.***

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
AGROINDUSTRIAL**

**AUTORES** :Br. ALEX RIVERA VILLACREZ  
Br. ADLER ELIO ROJAS MUÑOZ

**ASESOR** : Dra. FLOR GARCÍA HUAMÁN

**CHACHAPOYAS - PERÚ**

**2011**

## DEDICATORIA

*A mis padres José Rivera C. y Victoria Villacrez V. por su apoyo incondicional durante mis años de estudio y siempre.*

**ALEX RIVERA VILLACREZ**

*Con mucho amor para mi madre Marina Muñoz Conchez que día a día se sacrificó para darme un mañana mejor. A Dios quien guió mis pasos para lograr mi objetivo.*

**ADLER ELIO ROJAS MUNOZ**

## **AGRADECIMIENTO**

*A la Dra. Flor GarcíaHuamán, por guiarme y apoyarme en la realización de este trabajo. Por las horas de charla y discusión de resultados, por su paciencia y su permanente disposición. Por sus enseñanzas que me hicieron crecer.*

*A mis tíos Edilberto y Elizabeth, por apoyarme y animarme a ver el problema de la otra vereda.*

*A mis compañeros y amigos de la UNTRM-A quienes me acompañaron a lo largo de mi formación profesional.*

*A mis sobrinos Arasely, Jhoe y Nathaniel por inspirarme e iluminar cada día de mi vida haciendo más llevadero el esfuerzo.*

*De corazón a mis padres y hermanos por enseñarme el camino correcto y sostener siempre mis espaldas.*

*A dios y a todos los que me acompañaron durante el largo camino universitario.*

**ALEX RIVERA VILLACREZ**

*A Dios ante todo por fortalecerme y darme la vida para poder cumplir este trabajo.*

*Con mucho amor a mimadre Marina Muñoz Conchez que me dio motivación y fuerzas que hicieron posible realizar una de mis anheladas metas en las diferentes etapas de mi vida.*

*A mis hermanas y amigos por apoyarme siempre.*

**ADLER ELIO ROJAS MUÑOZ**

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL “TORIBIO RODRIGUEZ  
DE MENDOZA” DE AMAZONAS**

**Dr. Phhab VICENTE MARINO CASTAÑEDA CHÁVEZ**

*Rector*

**Ing. MsC. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLON**

*Vicerrector Académico*

**Ing. MsC. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLON**

*Vicerrector Administrativo*

**BLGA. ZOILA GUEVARA MUÑOZ**

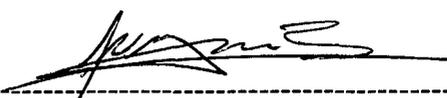
*Decana de la facultad de ingeniería*

## VISTO BUENO DEL ASESOR

El docente de la UNRTM-A que suscribe, hace constar que ha asesorado el proyecto y la realización de la tesis titulada “**CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE CULTIVO DE YOGURT Y FERMENTO DE CHICHA ARTESANAL, EN LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA TIPO KEFIR, A NIVEL DE LABORATORIO**”, presentado por los bachilleres **Alex Rivera Villacrez** y **Adler E. Rojas Muñoz**, egresados de la facultad de ingeniería agroindustrial de la UNRTM-A, dando el visto bueno y comprometiéndome a orientar en el levantamiento de observaciones y en la sustentación de la tesis.

Se expide la presente, a solicitud de los interesados, para los fines que estimen conveniente

Chachapoyas, 26 de abril del 2011



---

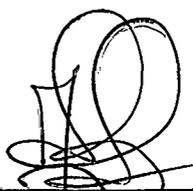
Dra. Flor Teresa García Huamán  
Profesora Asociada a dedicación exclusiva  
UNRTM-Amazonas

**LA PRESENTE TESIS HA SIDO APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO**



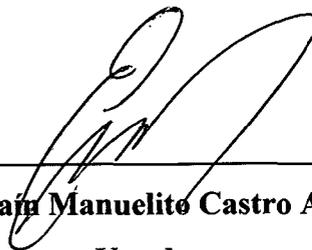
---

**Blgo. Oscar Gamarra Torres**  
**Presidente**



---

**Ing. Erik Aldo Auquiñivín Silva**  
**Secretario**



---

**Ing. Efraim Manuelito Castro Alayo**  
**Vocal**

## ÍNDICE

I. INTRODUCCION	1
II.MATERIALE Y METODO	7
2.1. MATERIALES	7
Materia prima	7
Insumos	7
Material de laboratorio	7
Otros materiales	8
Medios de cultivo	9
Equipos	9
Reactivos	10
2.2.METODOS	11
<b>A. Obtención y activación del cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal</b>	11
a.1) Obtención y activación del cultivo de yogurt	11
a.2) Obtención y selección del fermento de chicha	11
<b>B.Elaboración de la bebida fermentada tipo kefir</b>	12
B.1) Descripción de etapas	13
a) Recepción y control de calidad de la materia prima	13
b) Pasteurización y azucarado	13
c) Acondicionamiento de temperatura	13
d) Adición de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal	13
d.1) Diseño experimental	14
e) Fermentación	15
f) Desnatado y colado	15
g) Producto terminado	15
<b>C. Análisis estadístico de los datos fisicoquímicos y aceptación del producto</b>	15
c.1) Análisis estadístico de los datos fisicoquímicos	15
c.2) Análisis sensorial de aceptación	17
<b>D. Caracterización del producto final</b>	17
III.RESULTADOS	18
3.1. Análisis de la materia prima	18
a) Análisis fisicoquímico de la materia prima	18

b)Análisis microbiológico de la materia prima	18
3.2. Acondicionamiento de la temperatura para la fermentación	19
3.3. Terminada la fermentación	19
a) Análisis físico y químico de la bebida fermentada	19
b) Análisis estadísticos para los resultados fisicoquímicos de la bebida fermentada.	23
b.1) Efectos estimados para pH	23
b.2) Efectos estimados para la producción de acidez	26
b.3) Efecto estimado de la viscosidad aparente (Cp)	29
b.4) Efecto estimado para el porcentaje de sinéresis	31
b.5) Efectos estimados para la producción de porcentaje de alcohol	34
c) Análisis microbiológico de la bebida fermentada tipo kefir	37
d) Análisis sensorial de aceptación	37
d.1) Prueba de comparaciones múltiples para las características evaluadas: aroma, sabor, color y consistencia	39
d.2) Características cualitativas de la bebida fermentada tipo kefir	42
e) producto final	42
IV.DISCUSION	44
V.CONCLUSIONES	50
VI.RECOMENDACIONES	52
VII. BIBLIOGRAFIA	53
VIII.ANEXOS	58
Anexo N° 01: Métodos para el análisis fisicoquímico de la materia prima(leche)	59
Anexo N° 02: Técnicas para el recuento microbiológico	65
Anexo N°03: Métodos de análisis fisicoquímico de la bebida fermentada tipo kefir	69
Anexo N° 04: Modelo estadístico para un diseño factorial 2 <sup>2</sup>	72
Anexo N° 05: Análisis estadístico de los datos de la evaluación sensorial de aceptación	75
Anexo N° 06: Análisis estadístico para los resultados de las características fisicoquímicas de la bebida fermentada tipo kefir	77
Anexo N° 07: Resultados generales del análisis sensorial de aceptación de	

acuerdo a las características evaluadas (aroma, sabor, color y consistencia)	82
Anexo N° 08: Fotos obtenidas durante la ejecución del proyecto	86
IX.APÉNDICES	93
Apéndice N° 01: Test de análisis sensorial-prueba a nivel de aceptación a escala Hedónica	94
Apéndice N° 02: Normas técnicas nacionales para leche fresca	95
Apéndice N° 03: Normas técnicas internacionales para leches fermentadas	96

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 01: Factores de concentración con respecto a sus niveles de experimentación	16
TABLA N° 02: Valores promedios de parámetros fisicoquímicos evaluada a 4 muestras de leche fresca; comparado con los valores estándar	18
TABLA N° 03: Recuento promedio de microorganismos según tipo microbiológico en 4 muestras de leche; comparado con los valores estándar	18
TABLA N° 04: Valores obtenidos de parámetros fisicoquímicos para las 4 muestras de leche azucarada	19
TABLA N° 05: Valores promedios de densidad ( $g/cm^3$ ) de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas	20
TABLA N° 06: Valores promedios de °Brix de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas	20
TABLA N° 07: Valores promedios de pH de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas	21
TABLA N° 08: Valores promedios de producción de acidez (% ácido láctico) de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas	21
TABLA N° 09: Valores promedios de porcentaje de sinéresis de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas	22
TABLA N° 10: Valores promedios de viscosidad aparente (Cp.) de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas	22
TABLA N° 11: Valores promedios de producción de alcohol (%) de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas	23
TABLA N° 12: Combinación óptima de los niveles de concentración de los factores A y B para un valor máximo y mínimo de pH	23
TABLA N° 13: Combinación óptima de los niveles de concentración de los factores A y B, para una producción máxima y mínima de acidez	26
TABLA N° 14: Combinación óptima de niveles de concentración de los factores A y B, para un valor máximo y mínimo de viscosidad aparente (Cp.)	29
TABLA N° 15: Combinación óptima de niveles de concentración de los factores A y B, para un valor máximo y mínimo de % de sinéresis	31
TABLA N° 16: Combinación óptima de los niveles de concentración de los factores A y B, para una producción máxima y mínima de % de alcohol	34
TABLA N° 17: Recuento promedio de microorganismos según tipo microbiológico	

para las bebidas fermentadas tipo kefir de acuerdo a los tratamientos efectuados	37
TABLA N° 18:Análisis multivariante de varianza (MANOVA) para los resultados obtenidos de los panelistas evaluados de acuerdo a las características (aroma, sabor, color y consistencia) de los tratamientos efectuados a las cuatro muestras analizadas	38
TABLA N° 19:Contraste múltiple de rangos para el parámetro aroma según tratamiento	39
TABLA N° 20:Contraste múltiple de rangos para el parámetro saborsegún tratamiento	40
TABLA N° 21:Contraste múltiple de rangos para el parámetro color según tratamiento	40
TABLA N° 22:Contraste múltiple de rangos para el parámetro consistencia según tratamiento	41
TABLA N° 23:Valores promedios de parámetros fisicoquímicos de la bebida fermentada tipo kefir más relevante. Vs el valor estándar	43
TABLA N° 24:Recuento promedio de microorganismos según tipo microbiológico de la bebida fermentada tipo kefir más relevante. Vs valores estándar	43
TABLA N° 25: Interpretación de los resultados del test del azul de metileno	62
TABLA N° 26:Valores de densidad del agua de acuerdo a la temperatura	70
TABLA N° 27:Análisis de varianza para un experimento aplicando un diseño factorial 2 <sup>2</sup>	74
TABLA N° 28:Análisis de la Varianza para pH	77
TABLA N° 29: Análisis de la Varianza para producción de acidez (% ácido láctico)	78
TABLA N° 30:Análisis de la Varianza de la viscosidad aparente (Cp.)	79
TABLA N° 31:Análisis de la Varianza para % de sinéresis	80
TABLA N° 32:Análisis de la Varianza para la producción del % de alcohol	81
TABLA N° 33:Resultado general del panel evaluado para la característica aroma, de los diferentes tratamientos efectuados	82
TABLA N° 34:Resultado general del panel evaluado para la característica sabor, de los diferentes tratamientos efectuados	83
TABLA N° 35:Resultado general del panel evaluado para la característicacolor, de los diferentes tratamientos efectuados	84
TABLA N°36:Resultado general del panel evaluado para la característica	

consistencia, de los diferentes tratamientos efectuados	85
TABLA N° 37:Propiedades fisicoquímicas de acuerdo a los productos en particular	97
TABLA N° 38:Cantidad de microorganismo presente en las diferentes leches fermentadas	97
TABLA N° 39:Composición fisicoquímica de los diferentes productos	99
TABLA N° 40:Composición microbiológica de los diferentes productos	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 01: Diagrama de flujo de una bebida fermentada tipo kéfir, propuesta para el desarrollo del presente trabajo de investigación	12
Figura N° 02: Diseño experimental para evaluar la concentración óptima de cultivo de yogurt, y fermento de chicha artesanal en la elaboración de una bebida fermentada tipo kefir	14
Figura N° 03: Grafica de la superficie respuesta de valores de pH de acuerdo a la concentración de los factores utilizados	24
Figura N°04: Gráfica del contorno de la superficie respuesta, para un valor de pH máximo	25
Figura N° 05: Gráfica del contorno de la superficie respuesta, para un valor de pH Mínimo	25
Figura N°06: Grafica de la superficie respuesta para la producción de acidez de acuerdo a los factores utilizados	27
Figura N° 07: Grafica de contorno de la superficie respuesta, para una producción máxima de acidez (% de ácido láctico)	27
Figura N° 08: Grafica de contorno de la superficie respuesta, para una producción mínima de acidez (% ácido láctico)	28
Figura N°09: Grafica de la superficie respuesta para valores de viscosidad aparente (Cp), de acuerdo a la combinación de factores utilizados	29
Figura N° 10: Grafica de contorno de la superficie respuesta, para un valor máximo de viscosidad aparente (Cp.)	30
Figura N° 11: Grafica de contorno de la superficie respuesta, para un valor mínimo de viscosidad aparente (Cp.)	30
Figura N°12: Grafica de la superficie respuesta para el % de sinéresis de acuerdo a la concentración de los factores utilizados	32
Figura N° 13: Grafica de contorno de la superficie respuesta, para un valor máximo de % de sinéresis	32
Figura N° 14: Grafica de contorno de la superficie respuesta, para un valor mínimo de % de sinéresis	33
Figura N°15: Grafica de la superficie respuesta para la producción del % de Alcohol de acuerdo a la concentración de los factores en los tratamientos utilizados	35
Figura N° 16: Grafica de contorno de la superficie respuesta, para un valor	

máximo de producción de % de alcohol	35
Figura N° 17: Grafica de contorno de la superficie respuesta, para un valor mínimo, de producción de % de alcohol	36
Figura N° 18: Estructura del diseño factorial $2^2$	72

## **ÍNDICE DE FOTOS**

Foto N° 01: Muestras de kefir para ser evaluadas por los panelistas	86
Foto N° 02: Panelistas degustando nuestro producto (kefir)	86
Foto N° 03: Panelistas semientrenados en el análisis sensorial descriptivo	87
Foto N° 04: Determinación de la densidad del producto por el método del picnómetro	87
Foto N° 05: Midiendo el pH de nuestro producto (kefir)	88
Foto N° 06: Realizando mediciones tanto de pH como de viscosidad	88
Foto N° 07: Preparando la muestra de kefir para determinar porcentaje de grasa	89
Foto N°08: Preparando el equipo Soxhlet para determinar porcentaje de grasa	89
Foto N° 09: Utilizando la centrifuga para determinar sinéresis en el kefir	90
Foto N° 10: Preparando muestras con ácido bórico para determinar % de proteínas	90
Foto N° 11: Utilizando el equipo compacto de digestión MBC/02	91
Foto N° 12: Realizando las técnicas de recuento microbiológico	91
Foto N° 13: Muestras listas para la incubación por 24 h a una temperatura de 37 °C	92
Foto N° 14: Realizando la lectura de las placas, con el contador de colonias	92

## RESUMEN

La finalidad del presente trabajo de investigación fue elaborar una bebida fermentada tipo kefir utilizando como materia prima leche fresca que se comercializa en el mercado central de Chachapoyas proveniente de las microcuencas de Molinopampa y Chontapampa. Por lo que se inició el proceso con el control de calidad de la misma (análisis fisicoquímicos y microbiológicos) para determinar si cumplen con los parámetros establecidos en la norma técnica peruana.

Para obtener la bebida fermentada tipo kefir en este caso se optó por utilizar cultivo de yogurt liofilizado VIVOLAC DRI-SET 438, que contiene cepas de bacterias (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *Bulgaricus*), y fermento de chicha artesanal que contiene cepas de levaduras en diferentes concentraciones (5 ml y 20 ml de cultivo de yogurt, frente a 4 gr y 8 gr de fermento de chicha artesanal).

El objetivo principal del presente estudio fue: Evaluar la concentración óptima de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal en la elaboración de una bebida fermentada tipo kefir a nivel de laboratorio.

Para determinar el tratamiento que tenga la concentración óptima de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal en la obtención de la bebida fermentada tipo kéfir, se tuvo en cuenta los siguientes parámetros de control: análisis físico químico (pH, porcentaje de ácido láctico, porcentaje de alcohol, viscosidad aparente, porcentaje de sinéresis) y análisis microbiológico (recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables, recuento de coliformes totales y recuento de levaduras), además se evaluó las características de color, sabor, aroma, y consistencia con un análisis sensorial descriptivo (utilizando 9 jueces semientrenados) y un análisis sensorial de aceptación (utilizando 30 jueces no entrenados).

Palabras clave: bebida fermentada, kefir, chicha artesanal.

## **ABSTRACT**

The purpose of this research work was to develop a fermented drink kefir type used as raw material fresh milk to be marketed in the central market of Chachapoyas from the micro-watersheds of Molinopamba and Chontapampa. So we started the process with the quality control of the same (physico-chemical analysis and microbiological) to determine if they comply with the parameters set in the Peru's technical standard.

To achieve the fermented beverage type kefir in this case, we chose to use cultivation of yogurt lyophilisate VIVOLAC DRI-SET 438, which contains strains of bacterias (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*), and leaven of chicha artisanal that contains strains of yeast; at different concentrations (5 ml and 20 ml of cultivation of yogurt, compared with 4 gr and 8 gr of leaven of chicha artisanal).

The main objective of this study was: Evaluate the optimum concentration of cultivation of yogurt and ferment chicha artisanal in the elaboration of a fermented beverage type kefir at the laboratory level.

To determine the treatment that takes the optimum concentration of cultivation of yogurt and leaven of chicha artisanal in the breeding of the fermented beverage type kefir, took into account the following control parameters: Physical analysis chemical (pH, percentage of lactic acid, alcohol percentage, apparent viscosity, percentage of midway) and microbiological analysis (count of aerobic mesophile bacteria viable, total coliforms counts and count of yeasts), In addition, it evaluated the characteristics of color, flavor, aroma, and consistency with a sensory analysis descriptive (using 9 trained arbiters) and a sensory analysis of acceptance (using 30 judges not trained).

Key Words: fermented beverage, kefir, chicha artisanal.

## I. INTRODUCCIÓN

La leche es un fluido segregado por las glándulas mamarias de las vacas sanas, poco después del calostro, cuando nace la cría, es un líquido de composición compleja, blanco y opaco; sabor ligeramente dulce y pH casi neutro. (Guerrero, 2005). Mantiene en suspensión glóbulos de grasa y proteínas, es análoga al plasma sanguíneo y está constituida por lactosa, sales minerales y algunos otros elementos, de gran importancia industrial y para efecto del procesamiento de los derivados lácteos (Veisseyre, 1986).

La leche de vaca se caracteriza por poseer carbohidratos libres en solución en fase acuosa y unidos a proteínas entre ellos se encuentra la lactosa en una proporción promedio de 50g/L, que es hidrolizada a galactosa y glucosa por parte de microorganismos benéficos (Veisseyre, 1986. y Baqueiro, 2004) y también contaminantes (Baqueiro, 2004). Los lípidos son una fracción muy variable y depende del tipo de alimentación del ganado; se encuentra triglicéridos (96% del total de lípidos), fosfolípidos (entre 0,8% y 1,0%) y sustancias insaponificables (aproximadamente 1 %) (Donckers, 2010).

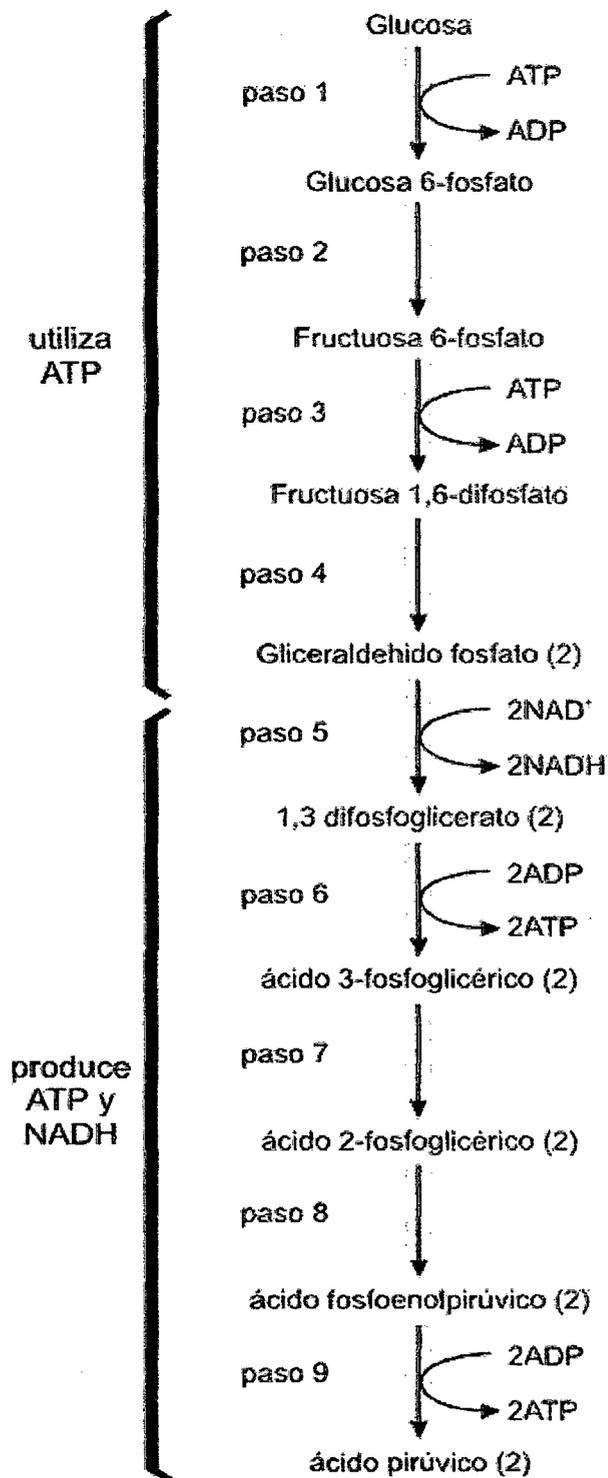
A partir de la leche se deriva una amplia gama de productos alimenticios, algunos de ellos implica el uso de la leche entera y otros sólo porciones de esta separadas mediante distintas operaciones. Dentro de estos productos podemos mencionar quesos frescos, madurados, cremas, mantequillas y leches fermentadas.

La fermentación es una forma simple, barata y segura de conservar la leche. En zonas en las que se dispone de modernos equipos de ordeño y de recogida de leche, y en donde, generalmente, se tiene un gran conocimiento y experiencia en las técnicas de conservación de la leche cruda, y que además cuentan con buenos sistemas de transporte y distribución, no se plantea la necesidad de utilizar la fermentación como un método de conservación. Por el contrario, en las áreas o países que no tienen todos estos medios, la fermentación de la leche como medio de conservación todavía mantiene importancia que tuvo originalmente. Las bacterias lácticas modifican las características de la leche, de forma que la mayoría de los microorganismos indeseables, incluidos los patógenos, no pueden crecer en ella, o incluso mueren. (Veisseyre, 1986; Walstra, 2001; Perez, 1984).

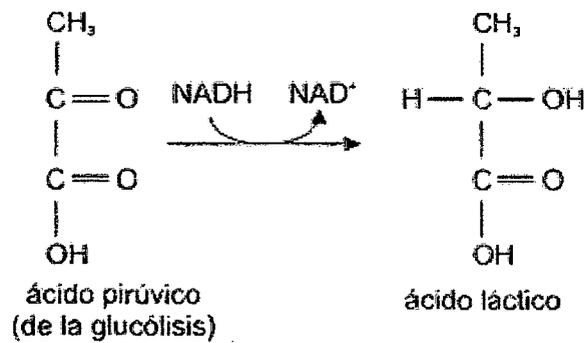
Las leches fermentadas son productos de consistencia semisólida en los que el fenómeno más importante es la transformación de la lactosa de la leche en ácido láctico u otros componentes, debido a la acción de microorganismos específicos que inoculan en la leche. Además de la transformación de la lactosa, se producen fenómenos de proteólisis y lipólisis por acción microbiana y enzimática, que confieren a los derivados unas determinadas características nutricionales y que también determinan su aroma, sabor y consistencia; una de ellas son las leches fermentadas acidificadas en las que se produce ácido láctico a partir de lactosa; el ejemplo el yogurt (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*), y leches fermentadas ácido-alcohólicas en las que los microorganismos inoculados a la leche conducen a la formación de, además de ácido láctico, alcohol etílico y dióxido de carbono (kefir [Cáucaso], kumis [Rusia], fuili [Finlandia], entre otros) (Astiasaran, 2000; Blasco, 1999).

Para la elaboración de leches fermentadas existen varios tipos de fermentaciones, entre las que podemos mencionar fermentaciones del tipo alcohólico, en las que la lactosa y/o un azúcar adicionado se transforma en etanol por la acción de las levaduras; fermentaciones mixtas en las que se producen al menos dos tipos de conversiones biológicas, la acidificación y la fermentación alcohólica; y la fermentación láctica en las que el principal sustrato es la lactosa, que se transforma en ácido láctico, en la mayor parte de estas fermentaciones la flora láctica se añade en forma de cultivos iniciadores cuyo objetivo es estandarizar los productos e impartirles características y propiedades específicas, que tengan por resultado mayor aceptabilidad de los mismos (Pérez, 1984).

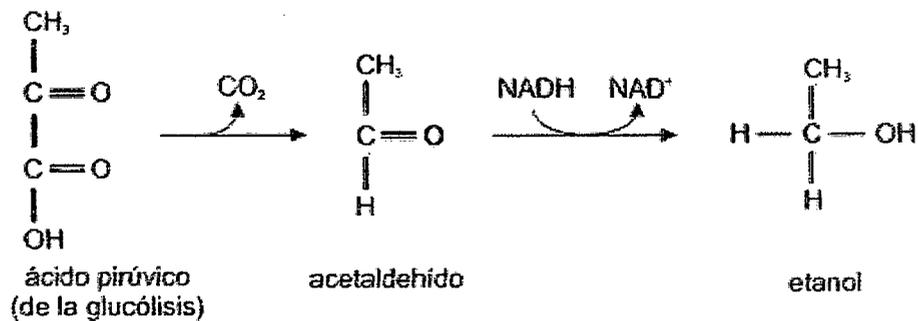
La producción de ácido láctico por efecto de las bacterias lácticas y la producción de alcohol en este caso por efecto de las levaduras, se obtiene a través de la vía glucolítica donde la lactosa y el azúcar adicionado se degradan en sus componentes (glucosa principalmente) las que son aprovechados por los microorganismos, que de acuerdo a Parés y Juárez (2002) se esquematiza en los gráficos de las figuras N° 01, 02 y 03;



**Figura N° 01:** Las dos etapas de la glucólisis. En la primera etapa se utilizan 2 ATP y la segunda produce 4 ATP y 2 NADH



**Figura N° 02:** Fermentación láctica



**Figura N° 03:** Fermentación alcohólica

Tradicionalmente el kefir ha sido y es, una bebida muy popular en Rusia y países limítrofes, así como en Hungría y Polonia, los cuales reportaron en 1998 producciones de más de 3 millones de litros al año. Tal es así que la antigua Unión Soviética cuenta con el 70% del consumo mundial de esta leche fermentada. Actualmente el kefir es bastante conocido en muchos países como Suiza, Francia, Finlandia, Alemania, Grecia, Austria, Brasil, España e Israel, y recientemente se ha hecho fácilmente disponible en los EE.UU. y Japón como una bebida étnica. (Flores, 2008).

El Kefir es una bebida láctea cremosa, burbujeante y acida. Su contenido en ácido láctico es del 0,7 – 1 %, y su proporción de alcohol varía entre el 0,5 y el 1 % de alcohol (Walstra, 2001).

Por otro lado, en América Latina, especialmente en Argentina, el consumo y elaboración de kefir se encuentra ampliando de forma artesanal. Siendo un material de

investigación de su concentración y de su beneficio a la salud, en las principales universidades de Argentina; tal es el caso de la tesis doctoral “Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kefir”, hecho por Garrote, G.2000. En la Universidad Nacional de la Plata. Mientras que en nuestro país, solo se conoce en forma teórica.

La micro flora del kefir, es variable. Lactococci (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, ssp. *cremoris*, y biovar *diacetylactis*), leuconostocs (*L. lactis*, *L. cremoris*), y lactobacilos (*L. brevis*, *L. kefir*, algunas veces *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, y *L. acidophilus*), forman ácido láctico, mientras que las levaduras como *Candida kluyveromyces* y *Saccharomyces*, producen alcohol. Parece que el verdadero kefir también contiene bacterias productoras de ácido acético. Típicamente, los organismos que intervienen en la fermentación se hallan formando unas estructuras granulares (granos). Durante la fermentación de la leche, los granos crecen como consecuencia de la coagulación de las proteínas y se unen entre si a través de los polisacáridos sintetizados (el kefirán). (Walstra, 2001; Varnan, 1995).

Cabe mencionar que desde los tiempos de Hipócrates, en la Grecia clásica, se conocía la importancia de la correcta limpieza y el buen funcionamiento del sistema digestivo. Y en la actualidad se ve la tendencia de las personas, al consumo de productos naturales ecológicos que puedan proporcionar beneficios a la salud. Tal es el caso de personas que padecen de mala digestión, y alergias, que no pueden disfrutar de sus comidas como los realizan normal otras personas. La importancia sanadora del Kefir en enfermedades de este tipo, no radica tanto en su acción directa sobre ellas, sino en favorecer una correctora digestión y preparar el sistema digestivo para que funcione al máximo de sus posibilidades, por otro lado los fermentos del Kefir permiten desdoblar la lactosa en glucosa y galactosa para que pueda ser absorbida por el intestino delgado así que como está pre digerida nuestro cuerpo no necesita realizar esta función. Por ello pueden tomarla incluso las personas con intolerancia a la lactosa. (Faggella, 2004).

Una de las principales funciones del kefir es regenerar la flora intestinal. Se trata de regenerar las infinitas bacterias que, en condiciones normales, viven en nuestro intestino grueso y cuya función es regular el tránsito de los desperdicios, fermentado la fibra para

facilitar su deposición. El consumo regular de kefir favorece la limpieza del intestino. (Zittlau, 2003).

El kefir no cura enfermedades específicas, ni hace milagros. Pero la acción del ácido láctico refuerza el organismo y el sistema inmunitario, lo que se traduce en una mejoría de la salud. Por esta razón se recomienda a muchas personas, con los trastornos más diversos. Por eso también su acción revierte positivamente apariencia externa, porque el cabello, la piel y la uñas son los más patentes reflejos de nuestro estado de salud. El kefir es un magnífico cosmético de vía interna. Se puede usar igualmente por vía tópica en el tratamiento de afecciones externas, porque es un poderoso antiséptico que ayuda a limpiar heridas, y al igual que el yogur, contribuye a curar infecciones genitales femeninas, por ejemplo la candidiasis, que es la proliferación de ciertos hongos en un medio poco ácido: el kefir acidifica el medio e inhibe su desarrollo. (Pérez, 2008).

Las dietas desequilibradas y el uso indiscriminado de antibióticos eliminan las bacterias beneficiosas para la salud y el sistema inmunológico, dañando la flora intestinal, y dejando el organismo susceptible a enfermedades. En tanto los alimentos fermentados como el kefir, son preciosos regeneradores de la población bacteriológica del intestino. (Honer, 1993).

Viendo las propiedades que tiene la micro flora, en la elaboración de kéfir, y desde el punto de vista de la salud es importante promover el consumo de alimentos que incluyan microorganismos probióticos. Por tanto el presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (laboratorio de tecnología agroindustrial, laboratorio de microbiología y el laboratorio de física), utilizando cultivo de yogurt liofilizado VIVOLAC DRI-SET 438, que contiene cepas de (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*), y fermento de chicha artesanal que contiene cepas de levaduras, para producir un bebida fermentada tipo kefir a nivel de laboratorio utilizando como sustrato la leche entera fresca proveniente de las cuencas lecheras de Molinopampa y Chontapampa, que se comercializan de forma ambulante en el mercado central, adicionándole un 5% de

sacarosa(azúcar blanca); evaluando los siguientes parámetros de control: análisis físico químico (pH, porcentaje de ácido láctico, porcentaje de alcohol, viscosidad aparente, porcentaje de sinéresis) y análisis microbiológico (recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables, recuento de coliformes totales y recuento de levaduras), además se evaluó las características sensoriales (color, sabor, aroma, y consistencia) del producto.

Dentro de este contexto, los objetivos del presente estudio fueron:

#### **Objetivo general**

- Evaluar la concentración óptima de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal en la elaboración de una bebida fermentada tipo kefir a nivel de laboratorio.

#### **Objetivos específicos**

- Elaborar una bebida fermentada tipo kefir de características físicas, químicas y organolépticas (aroma, sabor, color y consistencia) aceptables; teniendo como materia prima a la leche fresca comercializada en el mercado central de Chachapoyas.
- Determinar las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del producto final.

## **II. MATERIAL Y MÉTODO**

### **2.1. MATERIALES:**

#### **Materia Prima:**

Leche de vaca, fresca y entera obtenida del mercado central de Chachapoyas, que es procedente de las cuencas lecheras de Molinopampa y Chontapampa.

#### **Insumos:**

- Cultivo liofilizado VIVOLAC DRI-SET 438, que contiene cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*
- Fermento de chicha artesanal, que contienen cepas de levaduras
- Sacarosa, se utilizó azúcar blanca.

#### **Material de laboratorio:**

- Lactodensímetro calibrado a 84 °F
- Termómetro con rejilla de 0 a 100 °C
- Termómetro de -10 a 120 °C
- Bagueta de vidrio 20 cm
- Bureta de 50 mL
- Pipetas de 10 mL, 5 mL y 1 mL.
- Probetas de 250 mL y 500 mL.
- Vaso de precipitación de 10 mL., 250 mL, y 100 mL.
- Picnómetro de 50 mL y 100 mL.

- Tubos de ensayo para centrifuga de 13x100mm
- Tubos de ensayo con tapa de 16x150mm
- Pizetas de 500 ml con agua destilada
- Placa petris
- Tubos de ensayo de 13x100mm
- Tobos de ensayo de 16x150mm
- Campanas Durham
- Gradillas
- Lunas de reloj
- Pinzas de metal
- Soporte universal
- Espátula de metal
- Bombillas de jebe

**Otros materiales:**

- Tamiz de plástico
- Jarras de plástico capacidad de 1.5 lts
- Envases de plástico de capacidad de 1 lt.
- Vasos descartables de 3 Onz.
- Ollas de acero, capacidad de 5 L y 10 L.
- Gasas

- Cucharas de acero inoxidable
- Cinta de embalaje
- Cucharones de madera
- Plumón marcador

#### **Medios de cultivo:**

- Agar saboraud.
- Agar plate count.
- Caldo brilla.

#### **Equipos:**

- Balanza portátil capacidad 300 g x 0.01g. marca DIGITAL PRECISION. Modelo ES-200A
- Cocina semi industrial a gas de cuatro quemadores con horno. Marca SÜRGE
- Destilador semiautomático para determinación de nitrógeno y proteína. Marca RAYPA. Modelo DPN 2000
- Digestor. Sistema compacto de digestión. Marca RAYPA. Modelo MBC-6
- Equipo de extracción de grasas tipo soxhlet. Marca FISATOM. Modelo 502/2
- Estufa de secado y esterilización. Marca RAYPA. Modelo DO-9D
- Mufla. T° regulable hasta 1200 °C. capacidad 5L Pot. 4.2 KW/220 VAC 80 HZ. Marca PINZUAR LTDA
- pHmetro. Marca QUIMIS. Modelo Q400MT
- Refractómetro digital. Medición de brix 0 a 85 %, índice de refracción y temperatura. Marca MRC. Modelo REF-W.

- Refrigeradora sist. No frost, control de  $T^{\circ}$  electrónica, panel eléctrico control, sistema anti bacteriano. Alto 1.67m, ancho 67.5cm, fondo 71.5 cm. capacidad 600 L. marca LG. Modelo GM-R603YQ.
- Viscosímetro rotacional. Marca NAHITA. Modelo 801.
- Agitador magnético con calefacción. Marca QUIMIS. Modelo Q261-22
- Autoclave vertical. Marca IMKA
- Centrifuga. Marca KOSSODO S.A. K Centrifuga PLC series.
- Campana de desecación de 250 mm c/tapa y llave esmerilada. 24/29
- Contador de gérmenes. Marca KUNKE GERBER.

**Reactivos:**

- Alcohol etílico 68%
- Hidróxido de sodio (NaOH), 01N
- Fenolftaleína 1%
- Azul de metileno
- Alcohol etílico 96°
- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) Q.P. concentrado
- Acido clorhídrico (HCl) 0.25 N
- Sulfato de cobre anhidro ( $CuSO_4$ ) P. A.
- Selenio
- Sulfato potásico
- Acido bórico CN Biomedical

- Éter de petróleo Q.P.

## **2.2. METODOS :**

Para el desarrollo de este trabajo de investigación, se tuvo en cuenta cuatro etapas principales:

### **A. Obtención y activación del cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal.**

#### **a.1. Obtención y activación del cultivo de yogurt**

El cultivo de yogurt comercial liofilizado VIVOLAC DRI-SET 438, se obtuvo de los establecimientos de venta (puestos que elaboran y venden yogurt artesanal de la ciudad de Chachapoyas), por lo que se realizó la activación y acondicionamiento del mismo.

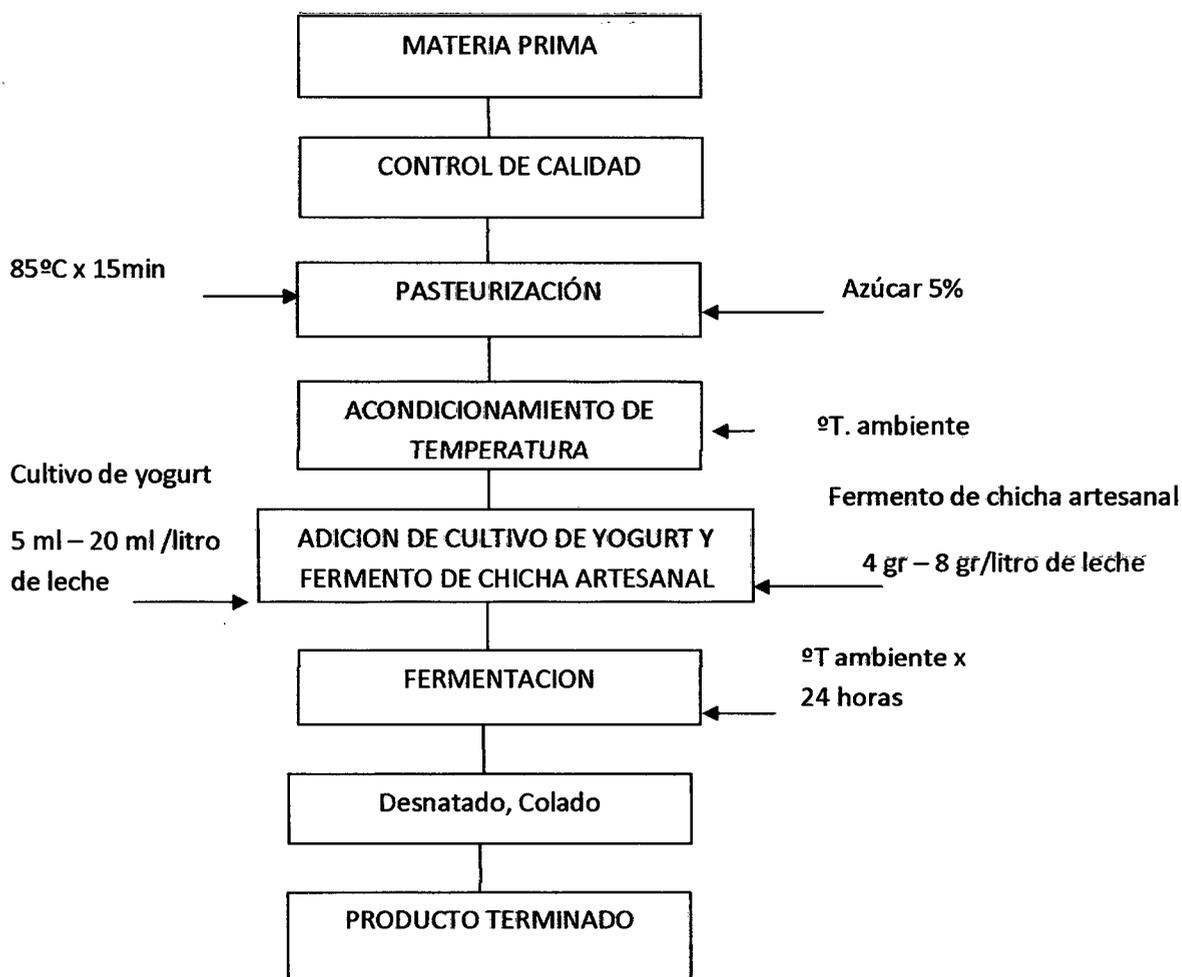
Como el cultivo comercial (sobres) es para inocular en 100 litros de leche, entonces se procedió a disolver este sobre en una muestra de leche (400ml.) previamente calentada (30-42 °C), logrando así su activación y acondicionamiento de los microorganismos presentes, los que fueron colocados en bolsas de plástico en cantidades de 5ml y 20ml conteniendo una concentración de  $0.35 \times 10^7$  UFC/mL y se congelaran hasta su utilización.

#### **a.2. Obtención y selección del fermento de chicha**

Las muestras de fermento, se obtuvieron de los establecimientos de venta de chicha artesanal (puestos de venta de ceviche del mercado central de Chachapoyas). Este fermento se guardó en agua azucarada, cambiando cada día este medio para lograr que el fermento siempre esté activado y en condiciones óptimas de fermentación. Luego se filtró y se separó el fermento del agua azucarada. El fermento semi sólido (que contiene las cepas de levadura en una concentración de  $0.45 \times 10^5$  UFC/gr) obtenido, fue depositado en papel aluminio, lo que facilitó su pesado (en gramos), para su utilización.

## B. Elaboración de la bebida fermentada tipo kefir

Las etapas a seguir para la elaboración de una bebida fermentada tipo kefir, propuesta para el desarrollo de este trabajo de investigación, se muestra en la figura N° 01; detallando las fases de experimentación en los incisos siguientes:



**Figura N° 04:** Diagrama de flujo de una bebida fermentada tipo kéfir, propuesta para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

**Fuente:** “Kefir” (Franco, 2008), acondicionado por los autores.

## **B.1. Descripción de etapas:**

**a) Recepción y control de calidad de la materia prima:** la recepción de la leche se hizo en horas de la mañana (de la 8: 00 a 9:00am), en el propio mercado central de Chachapoyas, y llevados inmediatamente a los laboratorios de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (Laboratorios de microbiología y laboratorio de tecnología agroindustrial) para realizar el control de calidad y posterior elaboración de la bebida fermentada.

Para determinar la calidad de la leche fresca entera se hizo, los análisis fisicoquímicos y microbiológicos (Veisseyre, 1986; Walstra, 2001; Vaman, 1995) que se mencionan en el Anexo N° 01 y Anexo N° 02 respectivamente.

### **b) Pasteurización y azucarado**

La leche luego de su evaluación de control de calidad, pasó a un proceso de pasteurización a 85 °C por un tiempo de 15 minutos (Blasco; 1999); en esta etapa se añadió azúcar blanca en un 5% (Walstra, 2001; Gómez, 2009).

### **c) Acondicionamiento de temperatura**

Pasado el tiempo de pasteurización, se puso a enfriar la leche hasta que llegue a una temperatura ambiente (Garrote, 2000; Zittlau, 2003), en nuestro caso fue de 20 °C temperatura promedio en el ambiente interno del laboratorio de tecnología agroindustrial, durante el desarrollo del experimento.

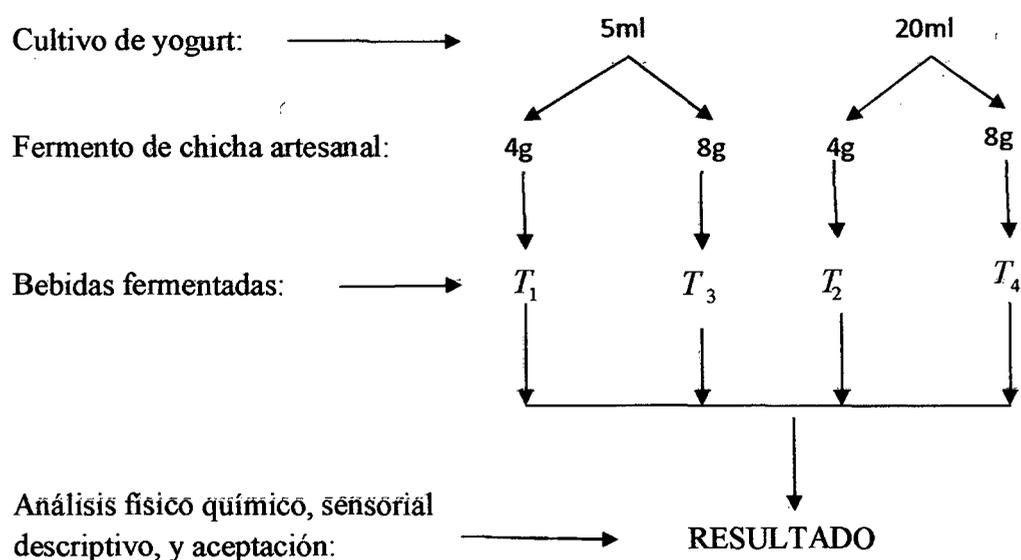
En esta etapa se determinó la densidad o gravedad específica de la leche azucarada y enfriada, por el método del picnómetro NTP 202.180 (INDECOPI, 1998). Por otro lado también se determinó el porcentaje de °Brix, realizado utilizando un refractómetro digital Marca MRC. Modelo REF-W. El detalle descriptivo de estos métodos de análisis se especifica en el Anexo N° 03.

### **d) Adición de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal.**

Una vez que se tuvo la leche acondicionada a temperatura ambiente, se desarrolló cada ensayo experimental de fermentación, con la adición de cultivo de yogurt comercial

(VIVOLAC DRI- SET 438) activado en cantidades comprendidos entre 5 ml y 20 ml; y fermento de chicha artesanal activado en cantidades comprendidas entre 4g y 8g, de acuerdo al siguiente detalle:

**d.1) diseño experimental.**



**Figura N° 05:** Diseño experimental para evaluar la concentración óptima de cultivo de yogurt, y fermento de chicha artesanal en la elaboración de una bebida fermentada tipo kefir.

A cada muestra obtenida de leche se aplicó cuatro tratamientos, y cuatro repeticiones respectivamente, las diferentes muestras fueron analizadas en días distintos; analizándose un total de cuatro muestras, a las cuales se les aplicó los cuatro tratamientos respectivos, con cuatro repeticiones de cada tratamiento, teniendo un total de 16 unidades experimentales por muestra, y resultando 64 unidades experimentales en total para el experimento.

### **e) Fermentación**

La fermentación se hizo a temperatura ambiente de la parte interna del laboratorio de Tecnología Agroindustrial, teniendo en cuenta la parte más lejanas a las ventanas, y tratando de que las muestras no estén en contacto directo con la luz solar (Honer, 1993). Este proceso fue controlado con un periodo de 24 horas como mínimo, ya que las bacterias del cultivo de yogurt actúan lentamente a temperatura ambiente (temperaturas bajo los 30°C) (Blasco, 1999).

### **f) Desnatado y colado**

Pasados las 24 horas de fermentación, se procedió a un breve desnatado, se batió suavemente, y se filtró para recuperar el fermento de chicha artesanal.

**g) Producto terminado:** Todas las muestras de bebida fermentada fueron analizadas en cuanto a sus características físicoquímicas y microbiológicas considerando que son propiedades que caracterizan a una leche fermentada (kefir) (Miquel, 2001); el detalle descriptivo para estos análisis se menciona en el Anexo N° 03, y Anexo N° 02 respectivamente. Para luego envasarlas y colocarlas a refrigeración (4°C).

## **C. Análisis estadístico de los datos físicoquímicos y aceptación del producto.**

**c.1. Análisis estadístico de los datos físicoquímicos:** Puesto que las características físicoquímicas son factores que ayudan a controlar la calidad de la bebida fermentada, en nuestro caso nos conviene identificar con que concentración tanto de cultivo de yogurt comercial como de fermento de chicha artesanal se logra elaborar una bebida fermentada tipo kefir que cumpla con los rangos óptimos permitidos; por lo tanto se planteó el análisis estadístico de los datos físicoquímicos, donde solo se tuvo en cuenta las variables de: acidez, pH, sinéresis, viscosidad y porcentaje de alcohol. Donde los resultados obtenidos, para los cuatro tratamientos aplicados a cada muestra fueron promediados de acuerdo a sus respectivas repeticiones, teniendo un total de cuatro promedios por muestra ( promedio de  $T_1$ , promedio de  $T_2$ , promedio de  $T_3$  y promedio de  $T_4$  ) como se analizó cuatro muestras

en tanto se tuvo cuatro promedios para cada tratamiento lo que para el análisis estadístico se acondicionó considerándolo a cada promedio como sus repeticiones para cada tratamiento. Por lo tanto fueron analizados mediante: Un experimento factorial  $2^k$  (2 factores con dos niveles (+: nivel alto, -: nivel bajo)) con 4 repeticiones; 16 corridas experimentales (Peña, 2002; Montgomery, 2004).

**TABLA N° 01:** factores de concentración, con respecto a sus niveles de experimentación.

Nivel de experimentación Factor de concentración	- : nivel bajo	+ : nivel alto
A: cultivo de yogurt ( $0.35 \times 10^7$ UFC/mL)	5mL	20mL
B: fermento de chicha artesanal ( $0.45 \times 10^5$ UFC/gr.)	4gr	8gr

Los factores de concentración con los parámetros de evaluación (Tabla N° 01), 5m y 20ml representan a valores comprendidos entre 5ml, 8ml, 11ml, 14ml, 17ml y 20ml. Y los rangos de 4gr y 8gr representan a los valores comprendidos entre 4gr, 5gr, 6gr, 7gr y 8gr.

Como estamos describiendo en este diseño aplicado se tiene dos factores, por lo que de acuerdo a Montgomery (2004), se planteó un modelo estadístico que se describe en el Anexo N° 04. Donde con el análisis de varianza, se calculó el resultado óptimo, en cada parámetro fisicoquímico evaluado, tanto en un valor de maximización, como de minimización, para así concluir con que tratamiento nos quedamos en función de sus

características. Este análisis estadístico se hizo utilizando STATGRAPHICS Plus para Windows versión 5.6.

**c.2. Análisis sensorial de aceptación:** Se planteó un análisis sensorial de aceptación para determinar que tratamiento de la bebida fermentada tipo kefir, tiene las características óptimas de aceptación y luego comparar con los resultados obtenidos en el ítem c.1. En el cual se emplearon 30 jueces semi entrenados. Las características sensoriales evaluadas fueron sabor, aroma, color y consistencia, a un nivel de significación del 5%. El análisis se efectuó utilizando un prueba hedónica con una escala de 1 al 5 puntos (Anzaldúa, 1994; y utilizado por Castañeda y otros, 2008) siendo las alternativas de respuesta las siguientes: “Me gusta mucho” (5), “Me gusta moderadamente” (4), “No me gusta ni me disgusta” (3), “Me disgusta moderadamente” (2), “Me disgusta mucho” (1). Los resultados fueron analizados por un análisis multivariante de varianza (MANOVA), bajo un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) (Anexo N° 05), luego se hizo una comparación entre tratamientos utilizando la prueba de Contraste Múltiple de Rangos con el método 95 de porcentaje de LSD (Ureña, 1999). Para la evaluación estadística se hizo con el programa Excel versión 2010, y el SPSS V.15 en español. El formato empleado en el análisis sensorial a escala hedónica se encuentra en el Apéndice N° 02.

**D. Caracterización del Producto final:** Los mejores tratamientos resultantes luego del análisis sensorial de aceptación, y comparadas con los resultados del ítem c.1. Fueron analizadas en cuanto a sus características físicas, químicas y microbiológicas. Para así tener una guía de las propiedades características de una bebida fermentada tipo kefir, que fue experimentada en este trabajo de investigación. La descripción de los métodos para estos análisis se describe en los Anexos N° 01, Anexo N° 02 y Anexo N° 03.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Análisis de la materia prima:

##### a) Análisis fisicoquímico de la materia prima:

**TABLA N° 02:** Valores promedios de parámetros fisicoquímicos evaluada a 4 muestras de leche fresca; comparado con los valores estándar.

<b>Parámetro fisicoquímico evaluado</b>	<b>Valores promedios obtenidos</b>	<b>Valores estándar (INDECOPI, 2003)</b>
Densidad a 15° C	1.030 $g/cm^3$	1.028 - 1.033 $g/cm^3$
pH	6.78	6.6 – 6.8
Acidez	16 °Domic	14 – 18 °Domic
Grasa cruda	4.5 %	3.2%
Grasa en materia seca	32 %	28%
Proteína total	4.46 %	3.25*
Solidos totales	12.68 %	11.4%
Solidos no grasos	8.18 %	8.2%
Humedad	87.32 %	88.6%
Prueba de alcohol (68 %)	Estable	No coagulable
Prueba de azul de metileno	Buena	Min. 4h

\*no se considera los valores nitrogenados no proteicos

**Fuente:** Elaborado por los autores

##### b) Análisis microbiológico de la materia prima:

**TABLA N° 03:** Recuento promedio de microorganismos según tipo microbiológico en 4 muestras de leche; comparado con los valores estándar.

<b>Tipo de microorganismo</b>	<b>Recuento promedio</b>	<b>Valores estándar (INDECOPI, 2003)</b>
Numeración de aerobios mesófilos (UFC/ml)	$4.52 \times 10^5$	Max. 1000000
Coliformes (NMP /ml)	70	Max. 1000

**Fuente:** Elaborado por los autores

### 3.2. Acondicionamiento de la temperatura para la fermentación.

Durante este proceso de acondicionamiento de la leche pasteurizada a temperatura ambiente (20° C), Se obtuvo los siguientes resultados físicoquímicos:

**TABLA N° 04:** Valores obtenidos de parámetros físicoquímicos para las 4 muestras de leche azucarada.

Parámetros físicoquímicos	Valores obtenidos			
	M1	M2	M3	M4
Densidad ( $g / cm^3$ )	1.047738	1.046777	1.047543	1.046667
°Brix	13.11	12.78	12.99	12.68

Fuente: Elaborado por los autores

### 3.3. Terminada la fermentación.

Transcurrida las 24 horas de fermentación, y luego de realizar el desnatado y el colado respectivo, se pasó al análisis de la bebida fermentada, obteniendo los siguientes resultados:

a) **Análisis físicoquímico de la bebida fermentada:** Las tablas N° 05, 06, 07, 08, 09, 10 y 11 muestran valores promedios de los tratamientos efectuados a cada muestra en días distintos en cuanto a sus características de la bebida fermentada: densidad, °Brix, pH, porcentaje de acidez, viscosidad aparente, porcentaje de sinéresis y porcentaje de alcohol respectivamente.

Teniendo en cuenta lo descrito en el inciso 2.2 de MATERIALES Y METODOS inciso B ítem d.1) del presente trabajo de investigación donde se tiene los tratamientos de las combinaciones de los factores A (cultivo de yogur) y B (fermento de chicha artesanal).

$T_1$  = 5ml de cultivo de yogur, y 4 gr de fermento de chicha artesanal

$T_2$  = 20ml de cultivo de yogur, y 4 gr de fermento de chicha artesanal

$T_3$  = 5ml de cultivo de yogur, y 8 gr de fermento de chicha artesanal

$T_4 = 20\text{ml}$  de cultivo de yogur, y 8 gr de fermento de chicha artesanal

**TABLA N° 05:** Valores promedios de densidad ( $g/cm^3$ ) de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas.

MUESTRAS EVALUADAS	TRATAMIENTOS EFECTUADOS			
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$
1	1.043266	1.044746	1.035019	1.040728
2	1.043162	1.043875	1.036255	1.041324
3	1.043055	1.044656	1.035247	1.040983
4	1.042812	1.044487	1.036134	1.042215
<b>PROMEDIO</b>	<b>1.043074</b>	<b>1.044441</b>	<b>1.035663</b>	<b>1.041312</b>

Fuente: Elaborado por los autores

**TABLA N° 06:** Valores promedios de °Brix de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas.

MUESTRAS EVALUADAS	TRATAMIENTOS EFECTUADOS			
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$
1	11.43	11.53	9.55	10.12
2	10.87	11.28	10.28	10.67
3	10.86	11.07	9.88	10.45
4	10.56	10.89	10.34	10.22
<b>PROMEDIO</b>	<b>10.93</b>	<b>11.19</b>	<b>10.01</b>	<b>10.36</b>

Fuente: Elaborado por los autores

**TABLA N° 07:** Valores promedios de pH de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas.

MUESTRAS EVALUADAS	TRATAMIENTOS EFECTUADOS			
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$
1	4.44	4.39	4.40	4.04
2	4.54	4.61	4.60	4.49
3	4.62	4.43	4.58	4.49
4	4.58	4.58	4.55	4.52
<b>PROMEDIO</b>	4.54	4.50	4.53	4.38

**Fuente:** elaborado por los autores

**TABLA N° 08:** Valores promedios de producción de acidez (% ácido láctico) de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas.

MUESTRAS EVALUADAS	TRATAMIENTOS EFECTUADOS			
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$
1	0.72	0.81	0.72	0.63
2	0.66	0.84	0.81	0.62
3	0.74	0.79	0.70	0.66
4	0.79	0.87	0.69	0.67
<b>PROMEDIO</b>	0.73	0.83	0.73	0.65

**Fuente:** Elaborado por los autores

**TABLA N° 09:** Valores promedios de porcentaje de sinéresis de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas.

<b>MUESTRAS EVALUADAS</b>	<b>TRATAMIENTOS EFECTUADOS</b>			
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$
<b>1</b>	64.62	62.05	64.72	62.72
<b>2</b>	61.30	59.52	63.24	58.05
<b>3</b>	60.54	55.39	62.20	61.24
<b>4</b>	61.33	59.99	62.01	61.17
<b>PROMEDIO</b>	<b>61.95</b>	<b>59.24</b>	<b>63.04</b>	<b>60.79</b>

**Fuente:** Elaborado por los autores

**TABLA N° 10:** Valores promedios de viscosidad (Cp.) de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas.

<b>MUESTRAS EVALUADAS</b>	<b>TRATAMIENTOS EFECTUADOS</b>			
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$
<b>1</b>	180	360	130	170
<b>2</b>	203	388	138	195
<b>3</b>	190	350	145	195
<b>4</b>	210	334	135	180
<b>PROMEDIO</b>	<b>195.75</b>	<b>358</b>	<b>137</b>	<b>185</b>

**Fuente:** elaborado por los autores

**TABLA N° 11:** Valores promedios de producción de alcohol (%), de cuatro tratamientos con respecto a cuatro muestras evaluadas.

<b>MUESTRA EVALUADA</b>	<b>TRATAMIENTOS EFECTUADOS</b>			
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$
<b>1</b>	0.58695	0.3927	1.66936	0.92006
<b>2</b>	0.49035	0.39676	1.39689	0.73158
<b>3</b>	0.60991	0.39978	1.63471	0.88186
<b>4</b>	0.50373	0.28389	1.3802	0.58209
<b>PROMEDIO</b>	<b>0.547735</b>	<b>0.368282</b>	<b>1.520290</b>	<b>0.778897</b>

**Fuente:** Elaborado por los autores

**b) Análisis estadísticos para los resultados físico químicos de la bebida fermentada**

**b.1) Efectos estimados para pH:**

**TABLA N° 12:** Combinación óptima de los niveles de concentración de los factores A y B, para un valor máximo y mínimo de pH

<b>Factor</b>	<b>Niveles de concentración</b>			
	<i>Inferior</i>	<i>Mayor</i>	Concentración para un valor máximo (4.54)	Concentración para un valor mínimo (4.38)
<b>A</b>	5 mL	20 mL	5mL	20 mL
<b>B</b>	4gr	8gr	4gr	8gr

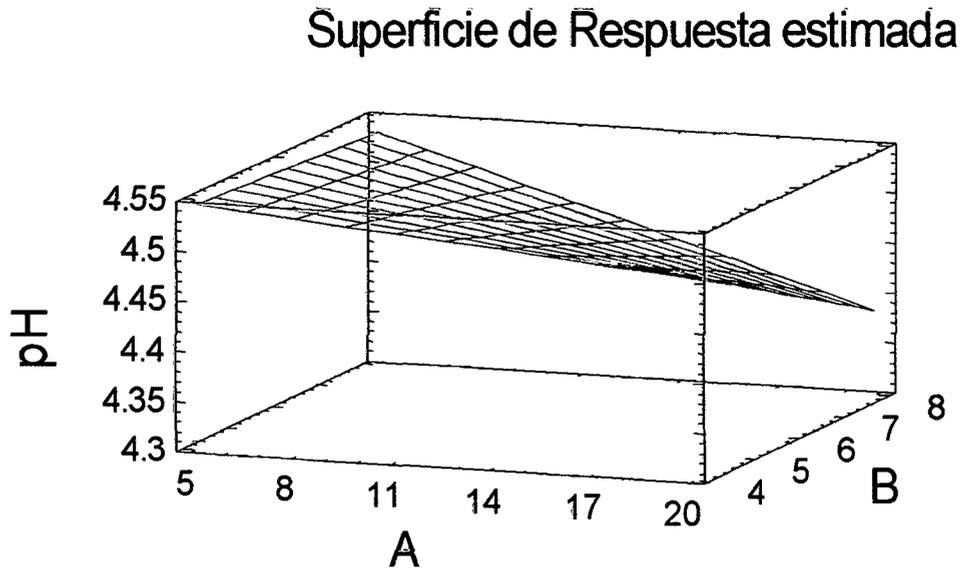
**Leyenda:**

A: Cultivo de yogurt

B: Fermento de chicha artesanal

**Fuente:** Elaborado por los autores

La figura N° 03, representa la gráfica de superficie respuesta tridimensional de valores obtenidos de pH, de acuerdo a la combinación de los niveles de factores utilizados en cada uno de los tratamientos.



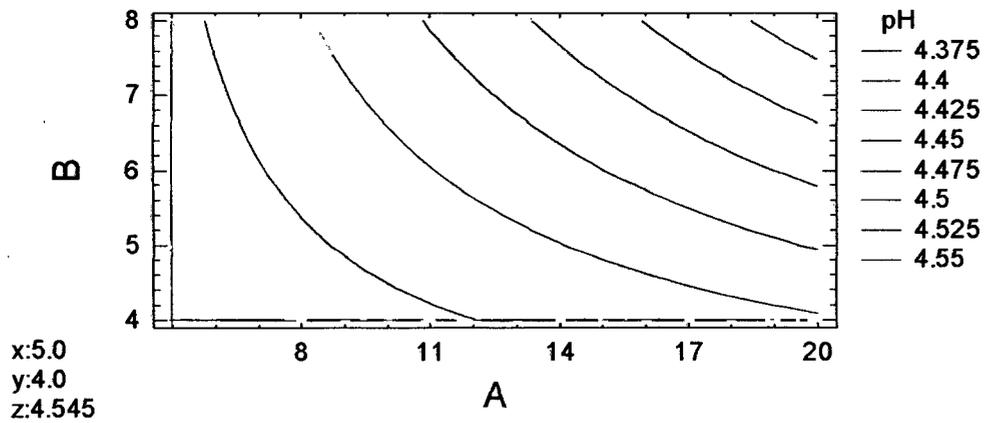
**Figura N°06:** Grafica de la superficie respuesta de valores de pH de acuerdo a la concentración de los factores utilizados.

**Leyenda:**

A: Cultivo de yogurt

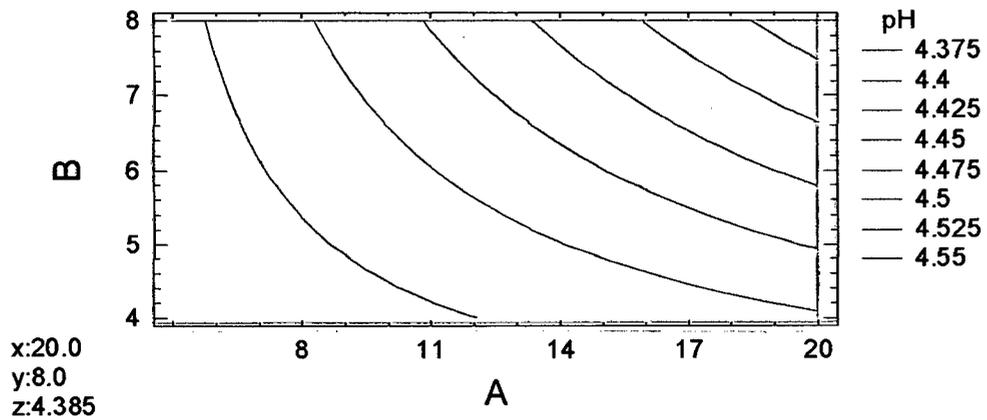
B: Fermento de chicha artesanal

### Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada



**Figura N° 07:** Gráfica del contorno de la superficie respuesta, para un valor de pH máximo.

### Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada



**Figura N° 08:** Gráfica del contorno de la superficie respuesta, para un valor de pH mínimo.

De las gráficas de contorno (figura N° 04 y figura N° 05), se observa que se obtiene pH altos cuando se utiliza los niveles mínimos de cultivo de yogurt y fermento de chicha

artesanal; e inversamente los valores de pH son bajos cuando se incrementa la concentración de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal.

**b.2) Efectos estimados para la producción de acidez (% de ácido láctico).**

**TABLA N° 13:** Combinación óptima de los niveles de concentración de los factores A y B, para una producción máxima y mínima de acidez (% ácido láctico).

Factor	Niveles de concentración			
	Inferior	Mayor	Concentración para un valor máximo (4.8275 %)	Concentración para un valor mínimo (0.645%)
A	5 mL	20 mL	20 mL	20 mL
B	4gr	8gr	4gr	8gr

**Leyenda:**

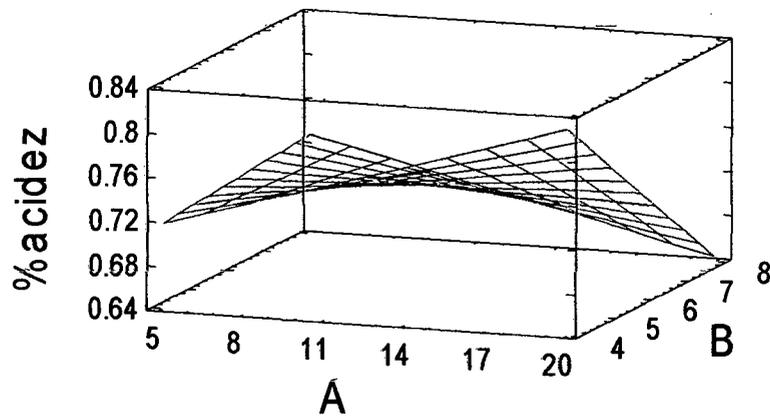
A: Cultivo de yogurt

B: Fermento de chicha artesanal

**Fuente:** Elaborado por los autores

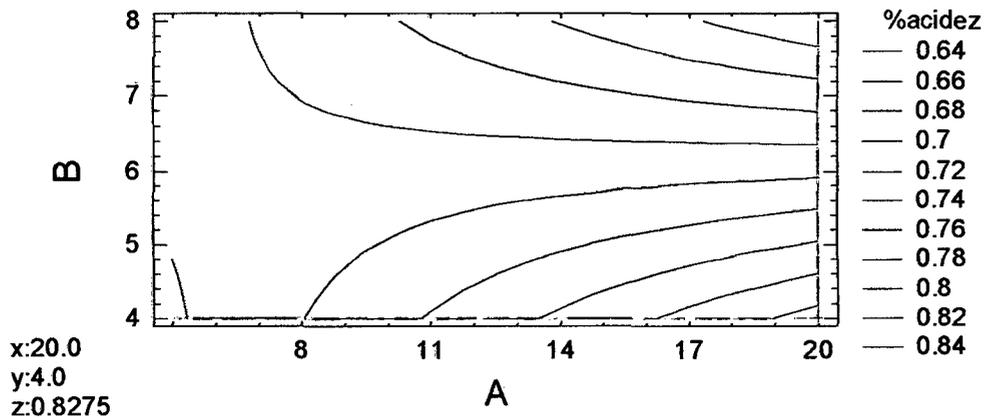
La figura N° 06, representa la gráfica de superficie respuesta tridimensional de valores obtenidos de producción de acidez (% de ácido láctico), de acuerdo a la combinación de los niveles de factores utilizados en cada uno de los tratamientos. Donde el factor A representa al cultivo de yogurt y el factor B representa al fermento de chicha artesanal.

### Superficie de Respuesta estimada



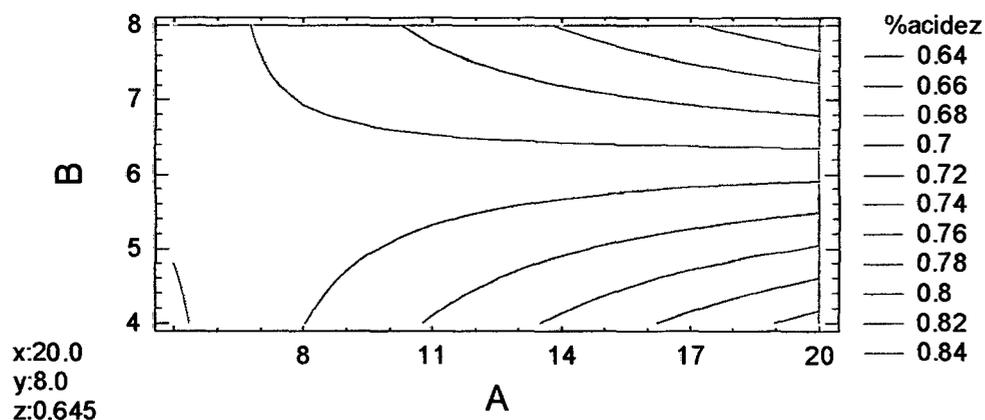
**Figura N°09:** Grafica de la superficie respuesta para la producción de acidez de acuerdo a los factores utilizados.

### Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada



**Figura N° 10:** Grafica de contorno de la superficie respuesta, para una producción máxima de acidez (% de ácido láctico)

### Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada



**Figura N° 11:** Grafica de contorno de la superficie respuesta, para una producción mínima de acidez (% ácido láctico)

**Leyenda:**

**A:** Cultivo de yogurt

**B:** Fermento de chicha artesanal

De las gráficas de contorno de la superficie respuesta (figura N° 07 y figura N° 08), se observa que la mayor producción de acidez (% de ácido láctico), se obtiene cuando se combina la mayor concentración de cultivo de yogurt (20 ml), con un bajo contenido de fermento de chicha artesanal (4 gr). Mientras que se obtiene una producción más baja de acidez (% de ácido láctico), con la combinación de la concentración más alta tanto de cultivo de yogurt como de fermento de chicha artesanal.

**b.3) Efecto estimado de la viscosidad aparente (cp.)**

**TABLA N° 14:** Combinación óptima de los niveles de concentración de los factores A y B, para un valor máximo y mínimo de viscosidad aparente (Cp.).

Factor	Niveles de concentración			
	Inferior	Mayor	Concentración para un valor máximo (358 Cp.)	Concentración para un valor mínimo (137 Cp.)
A	5 mL	20 mL	20 mL	5 mL
B	4gr	8gr	4gr	8gr

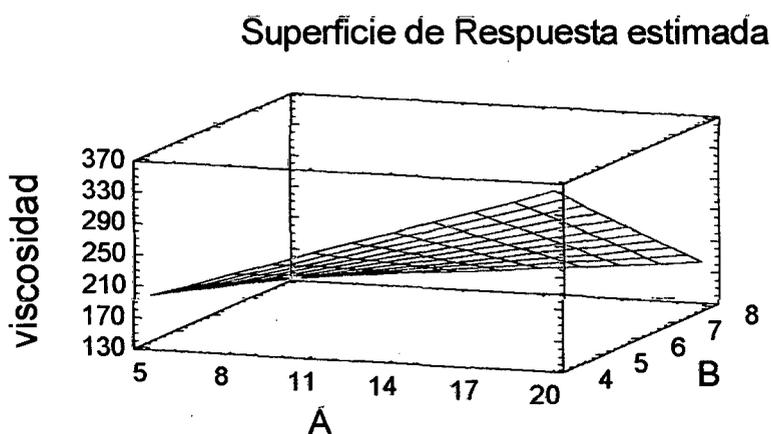
**Leyenda:**

A: Cultivo de yogurt

B: Fermento de chicha artesanal

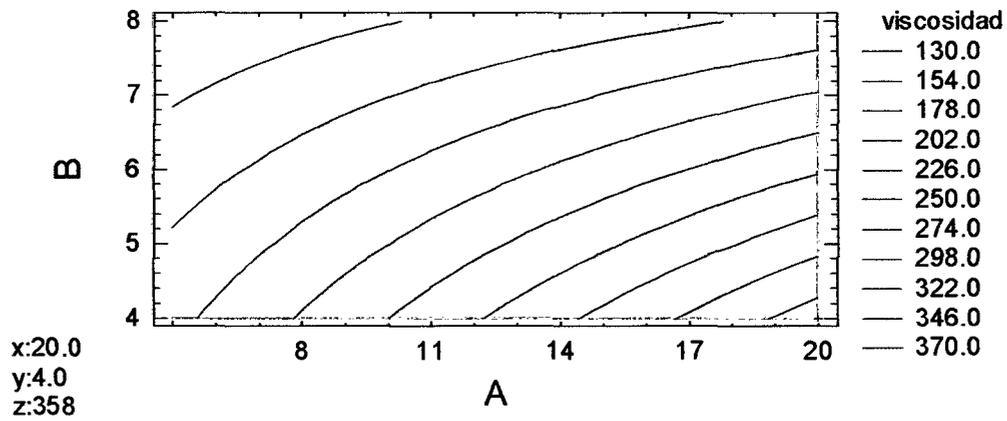
**Fuente:** Elaborado por los autores

La figura N° 09, representa la gráfica de superficie respuesta tridimensional de valores obtenidos de viscosidad aparente (Cp.) de acuerdo a la combinación de niveles de concentración de los factores utilizados en cada uno de los tratamientos. Donde el factor A representa al cultivo de yogurt y el factor B representa al fermento de chicha artesanal.



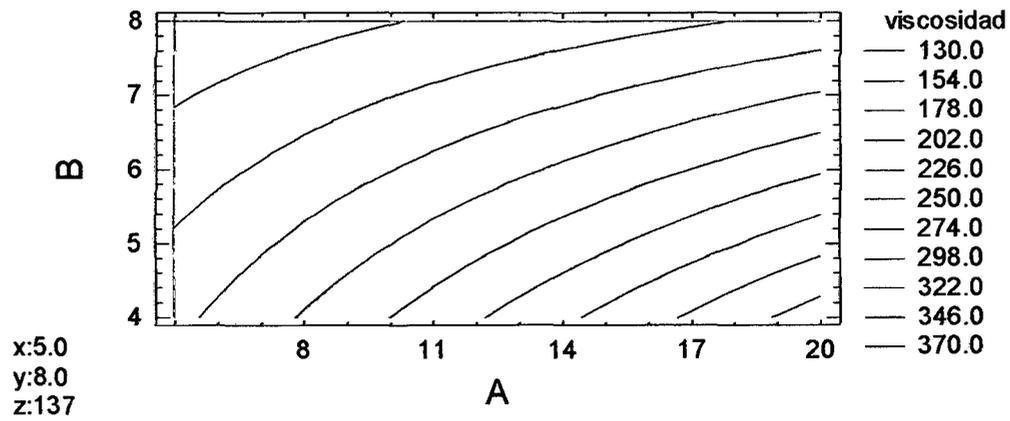
**Figura N° 12:** Grafica de la superficie respuesta para valores de viscosidad aparente (Cp), de acuerdo a la combinación de factores utilizados.

### Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada



**Figura N° 13:** Gráfica de contorno de la superficie respuesta, para un valor máximo de viscosidad aparente (Cp.).

### Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada



**Figura N° 14:** Gráfica de contorno de la superficie respuesta, para un valor mínimo de viscosidad aparente (Cp.).

Las gráficas de contorno de la superficie respuesta (figura N° 11 y figura N° 12), muestran que el valor máximo de viscosidad aparente (Cp), se logra con una combinación del nivel

alto del factor A (20 ml de cultivo de yogurt) y un nivel bajo del factor B (4gr de fermento de chicha artesanal). Inversamente se observa que el valor mínimo de viscosidad aparente se obtiene con un nivel bajo del factor A (5 ml de cultivo de yogurt), frente a un nivel alto del factor B (8gr de fermento de chicha artesanal).

#### b.4) Efectos estimados para el % de sinéresis

**TABLA N° 15:** Combinación óptima de los niveles de concentración de los factores A y B, para un valor máximo y mínimo de % de sinéresis.

Factor	Niveles de concentración			
	Inferior	Mayor	Concentración para un valor máximo (63.0425%)	Concentración para un valor mínimo (59.2375%)
A	5 mL	20 mL	5 mL	20 mL
B	4gr	8gr	8 gr	4 gr

#### **Leyenda:**

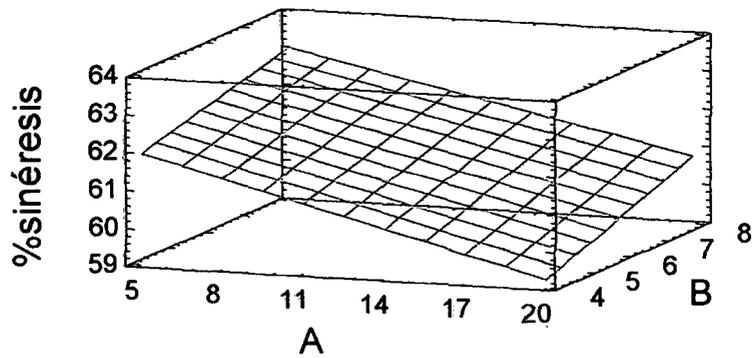
A: Cultivo de yogurt

B: Fermento de chicha artesanal

**Fuente:** Elaborado por los autores

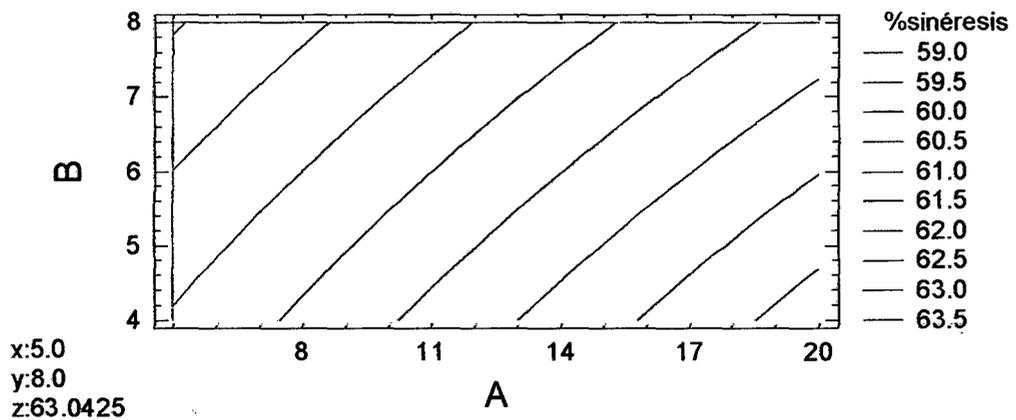
La figura N° 12, representa la gráfica de superficie respuesta tridimensional de valores obtenidos de % de sinéresis de acuerdo a la combinación de niveles de concentración de los factores utilizados en cada uno de los tratamientos. Donde el factor A representa al cultivo de yogurt y el factor B representa al fermento de chicha artesanal.

### Superficie de Respuesta estimada



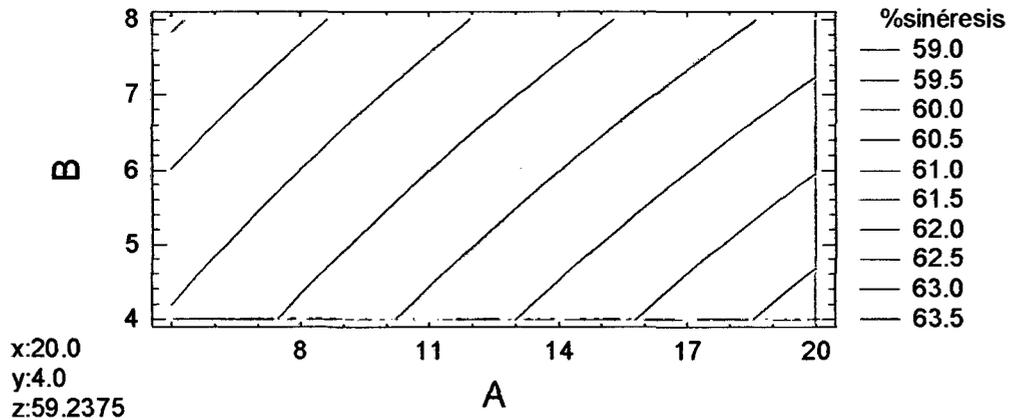
**Figura N°15:** Grafica de la superficie respuesta para el % de sinéresis de acuerdo a la concentración de los factores utilizados.

### Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada



**Figura N° 16:** Grafica de contorno de la superficie respuesta, para un valor máximo de % de sinéresis.

### Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada



**Figura N° 17:** Grafica de contorno de la superficie respuesta, para un valor mínimo de % de sinéresis.

**Leyenda:**

A: Cultivo de yogurt

B: Fermento de chicha artesanal

**Fuente:** Elaborado por los autores

En las gráficas de contorno de la superficie respuesta (figura N° 13 y figura N° 14), se observa que hay más % de sinéresis cuando se combina un nivel bajo del factor A (5 ml de cultivo de yogurt) con un nivel alto del factor B (8 gr de fermento de chicha artesanal). Mientras que se tiene un menor % de sinéresis si se combina un nivel alto del factor A (20 ml de cultivo de yogurt) con un nivel bajo del factor B (4 gr de fermento de chicha artesanal).

**b.5) Efectos estimados para la producción de % de alcohol**

**TABLA N° 16:** Combinación óptima de los niveles de concentración de los factores A y B, para una producción máxima y mínima de % de alcohol.

Factor	Niveles de concentración			
	Inferior	Mayor	Concentración para un valor máximo (1.52029%)	Concentración para un valor mínimo (0.36828%)
A	5 mL	20 mL	5 mL	20 mL
B	4gr	8gr	8 gr	4 gr

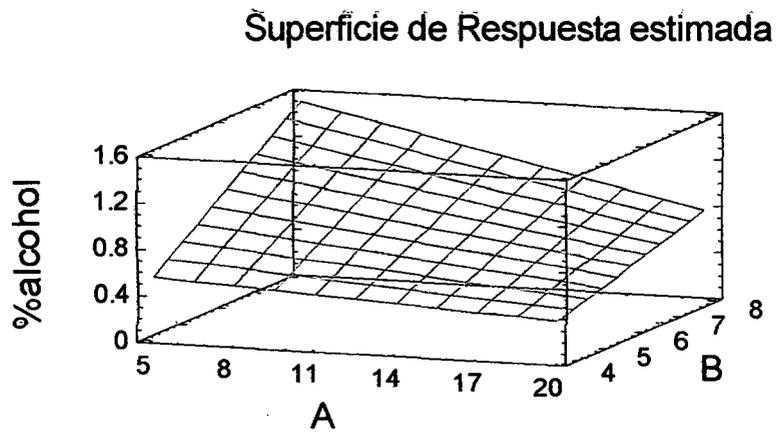
**Leyenda:**

A: Cultivo de yogurt

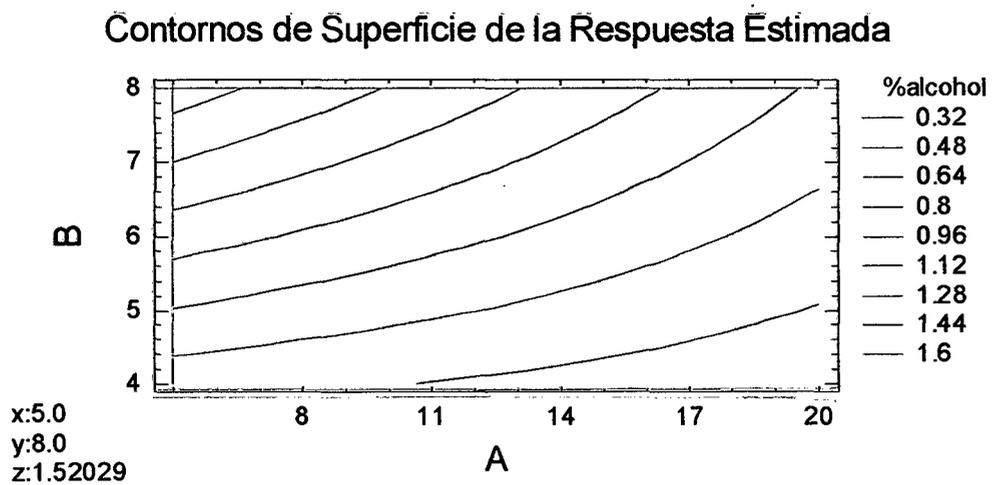
B: Fermento de chicha artesanal

**Fuente:** Elaborado por los autores

La figura N° 15, representa la gráfica de superficie respuesta tridimensional de valores obtenidos de % de alcohol de acuerdo a la combinación de niveles de concentración, de los factores utilizados en cada uno de los tratamientos. Donde el factor A representa al cultivo de yogurt y el factor B representa al fermento de chicha artesanal.

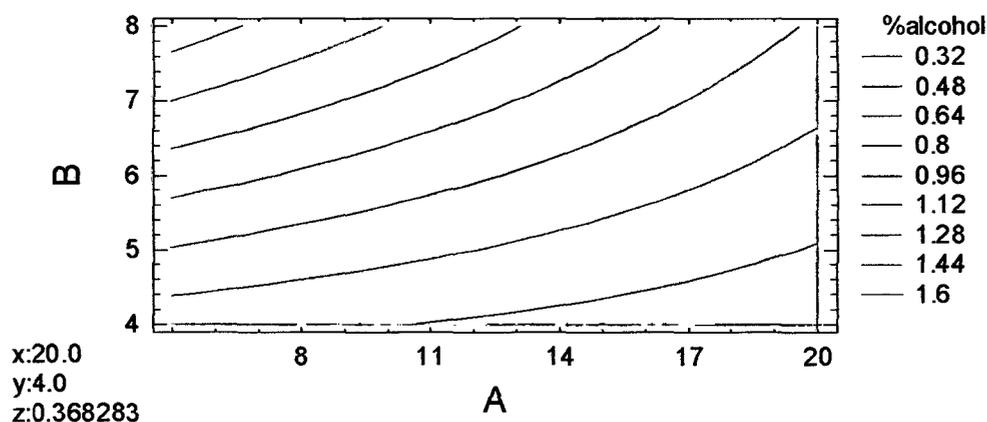


**Figura N°18:** Gráfica de la superficie respuesta para la producción del % de Alcohol de acuerdo a la concentración de los factores en los tratamientos utilizados.



**Figura N° 19:** Gráfica de contorno de la superficie respuesta, para un valor máximo de producción de % de Alcohol.

### Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada



**Figura N° 20:** Grafica de contorno de la superficie respuesta, para un valor mínimo, de producción de % de Alcohol.

#### Leyenda:

A: Cultivo de yogurt

B: Fermento de chicha artesanal

Fuente: Elaborado por los autores

Las gráficas de contorno de la superficie respuesta (figura N° 16 y figura N° 17) muestran que se obtuvo una mayor producción de % de Alcohol con las combinaciones de un nivel bajo del factor A (5 ml de cultivo de yogurt) y un nivel alto del factor B (8gr de fermento de chicha artesanal). Y el % de Alcohol más bajo se obtuvo con las combinaciones de un nivel alto del factor A (20 ml de cultivo de yogurt) frente a un nivel bajo del factor B (4gr de fermento de chicha artesanal).

**c) Análisis microbiológico de la bebida fermentada tipo kefir**

Los resultados obtenidos para garantizar la presencia de bacterias lácticas, como de levaduras productoras del porcentaje de alcohol en la bebida fermentada tipo kefir, se muestra en la Tabla N° 17.

**TABLA N° 17:** Recuento promedio de microorganismos según tipo microbiológico para las bebidas fermentadas tipo kefir de acuerdo a los tratamientos efectuados.

Tipo de microorganismo	Recuento promedio obtenido por tratamiento			
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$
bacterias lácticas (UFC/ml)	$1.76 \times 10^7$	$3.13 \times 10^7$	$1.85 \times 10^7$	$2.20 \times 10^7$
Levaduras fermentadoras (UFC/ml)	$5.89 \times 10^5$	$4.75 \times 10^5$	$5.63 \times 10^6$	$3.44 \times 10^6$

d) **ANÁLISIS SENSORIAL DE ACEPTACIÓN.** En la tabla N° 18, se muestra el análisis multi variante de varianza (MANOVA), correspondiente al modelo de bloques completamente al azar para la aceptación de la bebida fermentada tipo kefir, de acuerdo a sus características: Aroma, Sabor, color y consistencia; con un nivel de significación de 5 %.

**TABLA N° 18:** Análisis multivariante de varianza (MANOVA) para los resultados obtenidos de los panelistas evaluados de acuerdo a las características (aroma, sabor, color y consistencia) de los tratamientos efectuados a las cuatro muestras analizadas.

Fuente	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	
Panelistas	Aroma	38.24166667	29	1.318678	3.291179	0.0000	**
	Sabor	22.96666667	29	0.791954	1.127660	0.3268	
	Color	37.24166667	29	1.284195	3.809889	0.0000	**
	Consistencia	36.675	29	1.264655	2.380206	0.0011	**
Tratamientos	Aroma	1.891666667	3	0.630556	1.573751	0.2015	
	Sabor	1.4	3	0.466667	0.664484	0.5761	
	Color	1.425	3	0.475000	1.409207	0.2455	
	Consistencia	3.025	3	1.008333	1.897783	0.1359	
A	Aroma	0.075	1	0.075000	0.187186	0.6663	
	Sabor	0.033333333	1	0.033333	0.047463	0.8280	
	Color	0.408333333	1	0.408333	1.211424	0.2741	
	Consistencia	2.408333333	1	2.408333	4.532720	0.0361	*
B	Aroma	0.408333333	1	0.408333	1.019125	0.3155	
	Sabor	0.533333333	1	0.533333	0.759411	0.3859	
	Color	1.008333333	1	1.008333	2.991475	0.0873	
	Consistencia	0.408333333	1	0.408333	0.768524	0.3831	
A * B	Aroma	1.408333333	1	1.408333	3.514941	0.0642	
	Sabor	0.833333333	1	0.833333	1.186579	0.2790	
	Color	0.008333333	1	0.008333	0.024723	0.8754	
	Consistencia	0.208333333	1	0.208333	0.392104	0.5328	
Error	Aroma	34.85833333	87	0.400670			
	Sabor	61.1	87	0.702299			
	Color	29.325	87	0.337069			
	Consistencia	46.225	87	0.531322			
Total	Aroma	1623	120				
	Sabor	1612	120				
	Color	1839	120				
	Consistencia	1373	120				

\*Diferencia significativa.

En el caso de los panelistas se muestra que encontraron diferencia significativa en los parámetros de Aroma, Color y Consistencia a un nivel de significancia del 5 %. Esto indica que existe una diferencia significativa entre la opinión de los panelistas. Sin embargo en cuanto a los tratamientos se ve que no existe diferencia significativa, lo que se puede confirmar que en la elaboración de la bebida fermentada no tubo influencia la concentración de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal utilizado; por lo tanto se acepta la hipótesis nula, confirmándose que las variables independientes no tuvieron influencia significativa sobre la aceptación de la bebida fermentada en cuanto a sus características evaluadas (aroma, sabor, color y consistencia). Por otro lado se ve que la variable A (cultivo de yogurt), tuvo una ligera influencia significativa en cuanto al parámetro consistencia de la bebida fermentada.

Para mayor confirmación de estas diferencias significativas, se procedió a realizar el análisis de efectos múltiples con la prueba de Contraste Múltiple de Rangos.

**d.1. Prueba de comparaciones múltiples para las características evaluadas: Aroma, Sabor, Color y Consistencia.**

**TABLA N° 19: Contraste múltiple de rangos para el parámetro Aroma, según tratamiento.**

Tratamiento	recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	30	3.4	0.115567	X
2	30	3.56667	0.115567	XX
1	30	3.66667	0.115567	XX
4	30	3.73333	0.115567	X
Contraste	Diferencias	+/- Límites		
1-2	0.1	0.324848		
1-3	0.266667	0.324848		
1-4	-0.0666667	0.324848		
2-3	0.166667	0.324848		
2-4	-0.166667	0.324848		
3-4	*-0.33333	0.324848		

\*indica una diferencia significativa.

**TABLA N° 20:** Contraste múltiple de rangos para el parámetro Sabor, según tratamiento.

Tratamiento	recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	30	3.43333	0.153003	X
3	30	3.53333	0.153003	X
4	30	3.56667	0.153003	X
1	30	3.73333	0.153003	X
Contraste	Diferencias	+/- Límites		
1-2	0.3	0.430078		
1-3	0.2	0.430078		
1-4	0.166667	0.430078		
2-3	-0.1	0.430078		
2-4	-0.13333	0.430078		
3-4	-0.033333	0.430078		

\*indica una diferencia significativa.

**TABLA 21:** Contraste múltiple de rangos para el parámetro color según tratamiento

Tratamiento	recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
4	30	3.7	0.105998	X
2	30	3.6	0.105998	XX
3	30	3.86667	0.105998	XX
1	30	4	0.105998	X
Contraste	Diferencias	+/- Límites		
1-2	0.2	0.297951		
1-3	0.13333	0.297951		
1-4	*0.3	0.297951		
2-3	-0.06667	0.297951		
2-4	0.1	0.297951		
3-4	0.16667	0.297951		

\*indica una diferencia significativa

**TABLA 22:** Contraste múltiple de rangos para el parámetro consistencia según tratamiento

Tratamiento	recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
4	30	3.03333	0.133082	X
3	30	3.23333	0.133082	XX
2	30	3.4	0.133082	XX
1	30	3.43333	0.133082	X
Contraste	Diferencias	+/- Límites		
1-2	0.033333	0.37408		
1-3	0.2	0.37408		
1-4	*0.4	0.37408		
2-3	0.166667	0.37408		
2-4	0.366667	0.37408		
3-4	0.2	0.37408		

\*indica una diferencia significativa

Se puede afirmar que al 5 % de significancia en cuanto al parámetro **aroma** se tiene dos grupos homogéneos: primer grupo de menores resultados están los tratamientos  $T_3$ ,  $T_2$  y  $T_1$  y en el segundo grupo que obtuvieron los mayores puntos están los tratamientos  $T_2$ ,  $T_1$  y  $T_4$ ; mostrando una clara diferencia significativa entre los tratamientos  $T_3$  y  $T_4$ , de donde el que tuvo mayor aceptación en cuanto a su característica aroma fue el tratamiento  $T_4$ . Para el parámetro **sabor** no se encontró diferencia significativa ya que encontramos un solo grupo homogéneo. Mientras que para los parámetros de **color** y **consistencia** se mostró dos grupos homogéneos; **color**: primer grupo los que obtuvieron los más bajos puntos están los tratamientos  $T_4$ ,  $T_2$  y  $T_3$  y en el segundo grupo se tiene a los que obtuvieron los valores más altos dentro de estos están los tratamientos  $T_2$ ,  $T_3$  y  $T_1$ ; **consistencia**: los que obtuvieron menor puntaje son los tratamientos  $T_4$ ,  $T_3$  y  $T_2$ , el segundo grupo los de mayor puntuación están los tratamientos  $T_3$ ,  $T_2$  y  $T_1$  mostrando diferencias significativas entre los tratamientos  $T_4$  y  $T_1$ , de estos se deduce que el que tuvo mayor aceptación en cuanto a sus características de color y consistencia fue el tratamiento  $T_1$ .

## **d.2. Características cualitativas de la bebida fermentada tipo kefir**

Los siguientes conceptos muestran, las definiciones cualitativas de cada uno de los tratamientos de acuerdo a sus características sensoriales evaluadas.

$T_1$ : Un sabor ácido, cremosa con formación de burbujas de aire, percibiéndose un aroma característico a una leche fermentada ácida. Mostrando un color blanco.

$T_2$ : Un sabor ácido, de consistencia cremosa, mostrando algunas burbujas de aire, con un gel suave de color blanco, percibiéndose un aroma característico a una leche fermentada ácida.

$T_3$ : Un sabor ácido efervescente, con una consistencia ligeramente cremosa, con un gel suave y espumante, notándose la presencia de sinéresis y grumosidad en las paredes del envase, su color fue blanco ligeramente amarillento, percibiéndose un aroma característico a una leche fermentada ácida y ligeramente a una chicha de jora.

$T_4$ : Un sabor ácido poco efervescente, con un gel suave y cremoso, notándose mínimamente sinéresis, su color fue blanco con un aroma a una leche fermentada ácida, y mínimamente a una chicha de jora.

e) **Producto final:** la TABLA N° 23 y 24, muestran las características fisicoquímica y microbiológicas respectivamente, de la bebida fermentada tipo kefir que fue catalogada como la más adecuada, ya que tuvo resultados más favorables en cuanto a su análisis sensorial de aceptación, y su análisis fisicoquímico, que en este caso fue el tratamiento  $T_1$  (5 ml de cultivo de yogurt y 4 gr de fermento de chicha artesanal).

**TABLA N° 23:** Valores promedios de parámetros fisicoquímicos de la bebida fermentada tipo kefir más relevante. Vs el valor estándar.

Parámetro fisicoquímico	Valores promedios		Valores estándar (Codexstandard 243-2003)
	$T_1$	$T_4$	
Densidad a 20° C	1.043 g/cm <sup>3</sup>	1.041 g/cm <sup>3</sup>	-----
pH	4.55	4.385	4 – 4.6
Acidez titulable	0.73 %	0.645 %	Min. 0.6%
Sinéresis %	60.90 %	61.05 %	---
Viscosidad	195.75Cp.	185 Cp.	---
Alcohol	0.55 %	0.778 %	0.5 – 1.5 %
Grasa cruda	3.38 %	3.40 %	Menos del 10%
Grasa en materia seca	19 %	19.3 %	---
Proteína total	5.23 %	5.55 %	Min. 2.7 %
Solidos totales	15.11 %	15.13 %	-----
Solidos no grasos	11.73 %	11.73 %	-----
Humedad	84.89 %	84.87 %	-----

Fuente: Elaborado por los autores

**TABLA N° 24:** Recuento promedio de microorganismos según tipo microbiológico de la bebida fermentada tipo kefir más relevante. Vs valores estándar.

Tipo de microorganismo	Recuento promedio		Valores estándar (Codexstandard 243-2003)
	$T_1$	$T_4$	
Recuento de bacterias lácticas totales (UFC/ml)	1.76x10 <sup>7</sup>	2.20x10 <sup>7</sup>	Min. 10 <sup>7</sup>
Recuento de levaduras (UFC/ml)	5.89x10 <sup>5</sup>	3.44x10 <sup>6</sup>	Min. 10 <sup>4</sup>
Recuento coliformes (NMP /gr)	4	4	-----

Fuente: Elaborado por los autores

#### **IV. DISCUSIÓN**

A analizar la leche entera fresca de vaca procedente del mercado central de Chachapoyas, antes de iniciar la fase experimental se pudo determinar de acuerdo a cada característica evaluada (Tabla N° 02) que cumplía con los valores establecidos por la Norma Técnica Peruana para leche cruda (INDECOPI, 2003). Cabe recalcar que los valores obtenidos de sólidos totales, porcentaje de grasa estuvieron por encima de los mínimos recomendados.

Los resultados obtenidos de la leche analizada proveniente de razas Holstein, Brown Swiss y criollos sobre el contenido de grasa cruda 4.5%, grasa de materia seca 32%, y proteína de un 4.46 % están por encima de los valores reportados por Walstra (2001) donde se tiene 4 % de grasa, 31 % de grasa en materia seca y 3.25 % de proteína. Lo que puede explicar que estos componentes pueden ser variables por influencia de factores como la raza del animal, época de lactación, tipo de alimentación, etc (Donkers; 2010).

Al efectuarse la prueba del alcohol, las muestras de leche no coagularon siendo catalogadas como buenas (Veisseyre, 1986). Asimismo la prueba del azul de metileno dio un tiempo de decoloración por acción reductora de los microbios de más de tres horas considerándose como buena o satisfactoria (Veisseyre, 1986; Kirk, y otros, 1999).

Por otro lado las numeraciones de aerobios mesófilos, como de coliformes en la leche de vaca, estuvieron dentro de los parámetros recomendados indicado por la norma técnica peruana (INDECOPI, 2003), lo que confirma que son adecuados para la elaboración de productos lácteos fermentados (Guerrero, 2005).

El flujo de operaciones desarrollado en base a la utilización de leche cruda de vaca comercializada ambulante, fue tendiente a efectuar el proceso sobre un sustrato de buena calidad microbiológica, de preferencia estéril debido a que *Lactobacillus acidophilus*, y las levaduras crecen muy lentamente en la leche (Guerrero, 2005), y así evitar que otros microorganismos dominen la fermentación. En las citas bibliográficas aparecen, al igual que para el yogurt, kefir o cualquier leche fermentada, diferentes tiempos

y temperaturas de calentamiento (pasteurización) como por ejemplo de 120 °C por 15 a 20 minutos, o por ciclos de calentamiento de 95 a 98 ° C por 30 a 60 minutos (Butel, M. et al; 1998) o también el uso de leche pasteurizada a 85 °C (Veisseyre, 1986), o sometida a un calentamiento de 115 °C por unos segundos. En nuestro caso la temperatura del tratamiento térmico fue de 85 °C por 15 minutos lo cual nos dio excelentes resultados en el producto final, tener en cuenta la carga microbiana de la leche inicial fue un poco numerosa, pero nuestro producto fue elaborada a nivel de laboratorio; es decir el tratamiento térmico debe estar en relación con la cantidad y calidad de la carga microbiana inicial de la leche y el tiempo de vida del producto procesado (Guerrero, 2005).

Los resultados experimentales sobre los valores de pH (Tabla N° 12) reporta que se tiene una variación de un valor mínimo 4.385 a un valor máximo 4.545 por efecto de la concentración de los tratamientos utilizados. Notándose el pH más bajo con el tratamiento  $T_4$  (20 ml de cultivo de yogurt y 8 gr de fermento de chicha artesanal), y el pH más alto con el tratamiento  $T_1$ ; lo que explica que la protooperación de microorganismos en mayor cantidad (tanto de bacterias como de levaduras) tienen una mayor influencia en el descenso de pH (Walstra, 2001). Por otro lado de la figura N° 03 se observa que cuando se incrementa la concentración del cultivo de yogurt y el fermento de chicha artesanal se va a tener valores más bajos de pH en la bebida fermentada tipo kefir.

Tal como se nota en la figura N° 05, la producción de acidez (% de ácido láctico) depende de la concentración de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal, ya que se logra una mayor producción de acidez cuando se efectúa el tratamiento  $T_2$  (20 ml de cultivo de yogurt , con 4 gr de fermento de chicha artesanal), lo que confirma que las bacterias presentes en el cultivo de yogurt son las responsables mayoritariamente de la acidificación en las leches fermentadas (Ralph, 2000). Por otro lado en las referencias bibliográficas de leche acidofila se indica que en el proceso de fermentación se genera entre 0.6 % y 1 % de ácido láctico (Butel, M. et al; 1998), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por todos los tratamientos efectuados, ya que estos variaron desde una producción mínima de 0.65 % de ácido láctico que fue efectuada por el tratamiento  $T_4$  a una producción máxima de 0.83 % de ácido láctico efectuada por el tratamiento  $T_2$ .

De la figura N° 09. Se reporta que cuando se utiliza mayor concentración de cultivo de yogur ( $T_2$ ) se tiene una bebida fermentada más viscosa, es decir cremosa; lo que es contradictorio a cuando la concentración de fermento de chicha artesanal es mayor ( $T_3$ ), se va a tener una bebida ligeramente cremosa y efervescente. Esto confirma lo dicho en bibliografía que los microorganismos responsables de la producción de ácido láctico tiene una influencia marcada sobre la viscosidad de las leches fermentadas, ya que transforman la lactosa formando una capa "pilosa" o glicocáliz, que fundamentalmente son cadenas de polisacáridos constituidos por galactosa y otros glúcidos; estos polisacáridos desempeñan un papel importante en la consistencia de las leches fermentadas aunque van a depender del tipo de cepa utilizadas y el tipo de polisacárido sintetizado (Walstra, 2003). Por otro lado se tiene que cuando el pH de la caseína se acerca a su valor isoelectrico aumenta la viscosidad, por lo que se obtiene fácilmente productos más espesos, con textura de gel (Forsythe, 2003).

En cuando al porcentaje de sinéresis se observa que todos los tratamientos tuvieron un gel suave. En la figura N° 12 se observa un mayor porcentaje de sinéresis cuando se utilizó un elevada cantidad de fermento de chicha artesanal frente a una cantidad baja de cultivo de yogurt (tratamiento  $T_3$ ), pero si se utiliza cantidades mayores de cultivo de yogurt, frente a una cantidad mínima de fermento de chicha artesanal (tratamiento  $T_2$ ) se logra un porcentaje más bajo de sinéresis. Este fenómeno se debe fundamentalmente a una reorganización de la red, que da lugar a un aumento en el número de uniones entre partículas, como consecuencia, la red tiende a contraerse y a expulsar el líquido intersticial que encierra (Walstra, 2001). Por lado puede ser causa del movimiento que haya sufrido el envase que contiene el producto ya que por más leve que haya sido este movimiento cuando la gelación acaba de comenzar y el gel es todavía débil puede sufrir roturas localizadas que posteriormente se traducen en una intensa sinéresis; como también los cambios que sufren las proteínas durante la elaboración de la bebida fermentada, ya que estas resultan de gran importancia para la estabilidad del gel, porque están estrechamente relacionadas con el mejoramiento de la consistencia y viscosidad del producto al impedir la separación del suero o sinéresis (Tamine y Robinson 1995). En este trabajo de

investigación en el tratamiento  $T_3$  se nota la presencia de grumosidad y por tanto reporta el mayor porcentaje de sinéresis, esto puede ser por efecto de la mayor producción de alcohol que efectuó este tratamiento (figura N° 16). Puesto que confirma en bibliografía sobre elaboración de Kumiss, que tiene un porcentaje de alcohol sobre el 1 %, que es una bebida efervescente y con presencia de grumos en las paredes del recipiente que lo contiene (Palencia, 2004).

Los resultados obtenidos sobre la producción de porcentaje de alcohol (figura N° 16) muestran que la mayor producción de alcohol (1.52029) se tiene con el tratamiento  $T_3$  (5 ml de cultivo de yogurt, y 8 gr de fermento de chicha artesanal), seguidos por los valores de 0.85342 %, 0.53425 % y 0.368283 % con los tratamientos  $T_4$ ,  $T_1$  y  $T_2$  respectivamente. Lo que indica lo reportado en bibliografía sobre elaboración de kefir, que los responsables primordiales de la producción de alcohol y CO<sub>2</sub> en las leches fermentada son las levaduras, (Walstra, 2001; Blasco, 1999), de esto se puede afirmar que cuando se incrementa la cantidad de fermento de chicha artesanal se tiene valores elevados de producción de alcohol.

Por otro lado teniendo en cuenta el análisis de varianza hecha para cada uno de los parámetros físicoquímicos demostró que no existía diferencia significativa en el parámetro pH, pero si notándose diferencias significativas en cuanto al porcentaje de acidez, porcentaje de sinéresis, viscosidad aparente y porcentaje de alcohol, de acuerdo a la concentración de los tratamientos utilizados con un nivel de significancia del 5 % ( ver Anexo N° 05 en las Tablas N° 28,29,30,31 y 32), este resultado se puede contrastar con el trabajo de investigación realizado por Gutiérrez (2008), quien en su trabajo de investigación efecto del porcentaje de inóculo y del tiempo de incubación sobre las características físico químicas del kefir, afirma que el análisis de varianza demuestra que existe una diferencia significativa entre las características del kefir (% de acidez, % de sinéresis, viscosidad aparente y el % de alcohol) mas no teniendo una diferencia significativa en cuanto al pH con un nivel de 5 % de probabilidad.

En tanto al análisis microbiológicos de la bebida fermentada, se tiene que los resultados (Tabla N° 28) estuvieron por encima de los mínimos recomendados por la norma del Codex

para leches fermentadas (Codexstandard 243-2003). Mostrando que todos los tratamientos efectuados a temperatura ambiente tuvieron un desarrollo adecuado de microorganismos.

De la escala hedónica utilizada para el sensorial de aceptación, muestra que el grado de aceptación estuvo sobre el rango de No me gusta ni me disgusta (3) a Me gusta moderadamente (4); donde los panelistas evaluados mostraron una inclinación por el tratamiento  $T_4$ , en cuanto al parámetro aroma. Mientras que para el sabor no encontraron diferencia significativa entre tratamientos. No obstante en cuanto al color y la consistencia los panelistas mostraron una clara aceptación al tratamiento  $T_1$ . De esto se puede afirmar que los resultados promedios obtenidos reflejan que el panel evaluado tienen una ligera aceptación del producto en cuanto a sus características de aroma, sabor, color y consistencia; este puede ser porque nuestro producto tenía bajo porcentaje de azúcar, también se dice que los panelistas no han consumido antes un kefir, y que las respuestas reportadas fueron imaginándose a un yogurt.

Del análisis multivariante de varianza (MANOVA)(Tabla N° 18) para el atributo sensorial de aroma, muestra una diferencia estadística con un nivel de significancia del 5 % mostrando una mayor preferencia de los panelistas por el tratamiento  $T_4$  (20 mL de cultivo de yogurt y 8 gr de fermento de chicha artesanal) quien reporta el promedio más alto de aceptación (Tabla N° 19) y comparándole con sus características fisicoquímicas (figuras N° 03, 06, 09, 12 y 15) se tiene un pH de 4.385, ácido láctico (0.645 %), viscosidad aparente (184.99 Cp.), porcentaje de sinéresis (61.05 %) y una producción de alcohol (0.7788%); de donde se confirma de que el tratamiento  $T_4$  esta dentro del rango de las propiedades fisicoquímicas que se menciona en bibliografía: pH de 4 a 4.6, acidez 0.6 a 1 %, porcentaje de alcohol 0.5% a 1% (Walstra, 2003; Blasco, 1999).

En cuanto a la característica sabor (Tabla N° 18) no encontraron diferencia significativa, con un nivel de significancia del 5 %; sin embargo los promedios generales (Tabla N° 20) reportan una mayor preferencia de los panelistas por el tratamiento  $T_1$  (5 mL de cultivo de yogurt y 4 gr de fermento de chicha artesanal). y expresándole de acuerdo al resultado de sus características físico químicas: pH = 4.55, % acidez = 0.72, % de sinéresis

= 60.90, viscosidad aparente 195.75 Cp. Y % de alcohol = 0.58; se tiene a que cumple con los requisitos para una leche fermentada como el kefir: pH = 4 a 4.6, % acidez = 0.6 a 1; % de alcohol = 0.5 a 1. (Walstra, 2003; Blasco, 1999).

Para los atributos color y consistencia (Tabla N° 18) muestra que se encontraron diferencia significativa con un nivel de significancia del 5 % ; mostrando un promedio de preferencia de los panelistas por el tratamiento T<sub>1</sub> (5 mL de cultivo de yogurt y 4 gr de fermento de chicha artesanal), el cual expresándole de acuerdo a sus características fisicoquímicas como lo mencionamos anteriormente se ve que cumple con los parámetros catalogados para una leche fermentada como el kefir.

De los parámetros físico químicos obtenidos al evaluar al producto adecuado, se puede observar que puede ser clasificado como leche fermentada o cultivada entera o integral por los contenidos de acidez, grasa y pH del producto final (Tabla N° 23) (MERCOSUR, 1997; Codexstandard 243-2003).

El análisis de proteína realizado a la bebida fermentada tipo kefir dio como resultado un 5.23 % de proteína en la muestra, este resultado es mucho mayor al resultado mínimo de proteína para un kefir que es 2.7 % lo reportado por el codex para leches fermentadas (Codexstandard 243-2003), esto es un punto a favor ya que nuestro producto puede ser considerado rico en proteína. Este resultado según bibliografía se debe a la presencia de levaduras quienes en su afán de producir alcohol secretan nitrógeno (Forsythe, 2003).

## V. CONCLUSIONES

- La concentración óptima de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal para la elaboración de una bebida fermentada tipo kefir de acuerdo al atributo sensorial de aceptación: Aroma, comparado con las características fisicoquímicas, lo obtuvo el tratamiento  $T_4$  (20 ml de cultivo de yogurt y 8 gr de fermento de chicha artesanal).
- La concentración óptima de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal para la elaboración de una bebida fermentada tipo kefir de acuerdo a los atributos sensorial de aceptación: Sabor, Color y Consistencia comparado con sus características físicoquímicos lo obtuvo el tratamiento  $T_1$  (5 ml de cultivo de yogurt y 4 gr de fermento de chicha artesanal).
- Se elaboró una bebida fermentada tipo kefir con características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas (aroma, sabor, color y consistencia) catalogada dentro del rango que reporta las normas internacionales (Codexstandard 243-2003; Mercosur, 1997).
- En la evaluación de las características fisicoquímicas de la bebida fermentada se obtuvieron los siguientes resultados: Tratamiento  $T_1$ : proteína total 5.23%, pH 4.55 , acidez 0.72 % de ácido láctico, densidad 1.043 gr/cm<sup>3</sup>, viscosidad 195.75 Cp., sinéresis 60.9 %, grasa 3.38 %, alcohol 0.55 %. Tratamiento  $T_4$ : proteína total 5.55%, pH 4.385, acidez 0.645 % de ácido láctico, densidad 1.041gr/cm<sup>3</sup>, viscosidad 185. Cp., sinéresis 61.04 %, grasa 3.40 %, alcohol 0.778 %. Estos valores se encuentran dentro de los parámetros normales reportadas por el Codex para de leches fermentadas.
- En cuanto al análisis microbiológico de la bebida fermentada se tiene resultados: Tratamiento  $T_1$ : recuento de bacterias lácticas totales  $1.76 \times 10^7$  UFC/ml, recuento de levaduras fermentadoras  $5.89 \times 10^5$  UFC/ml y recuento de coliformes totales 4 NMP/gr; Tratamiento  $T_4$ : recuento de bacterias lácticas totales  $2.20 \times 10^7$  UFC/ml, recuento de levaduras fermentadoras  $3.44 \times 10^5$  UFC/ml y recuento de coliformes totales 4 NMP/gr. De

donde concluye que las bacterias lácticas totales, como las levaduras presentes, presentaron recuentos que permitieron catalogar al producto obtenido como leche fermentada, además de comprobarse que cumplía con las normas internacionales para leches fermentadas o cultivadas (Codexstandard 243-2003; Mercosur, 1997).

- Las bebidas fermentada tipo kefir catalogadas como como las más relevante tuvieron las siguientes características: Un sabor ácido, cremosa con formación de burbujas de aire, percibiéndose un aroma característico a una leche fermentada ácida (a diacetilo) y un color blanco.
- De acuerdo a la escala hedónica se obtuvo una aceptación de la bebida fermentada tipo kefir a un nivel moderado. Estos resultados ofrecen una buena posibilidad de la utilización del fermento de chicha artesanal en combinación con el cultivo de yogurt en la elaboración de productos lácteos fermentados.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Adicionar algún tipo de edulcorante para mejorar la aceptabilidad del consumidor, también se puede adicionar concentrados de frutas para mejorar el sabor y enmascarar el sabor ácido que no agrada a la mayoría de los consumidores, además de la aceptabilidad que tiene en el mercado los productos con fruta.
- Continuar con el estudio de la elaboración de kefir, teniendo en cuenta la vida útil del producto y la estabilidad de las características fisicoquímicas a un tiempo de almacenamiento prolongado.
- Realizar un estudio de mercado para ver y saber a que tipo de consumidores va dirigido nuestro producto así como también los precios hacer adquiridos.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- ANZALDUA, M. A. (1994). “**La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**”. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- ASTIASARAN, I. y MARTÍNEZ, A. (2000). “**Alimentos, composición y propiedades. Leche y Derivados**”. Editorial Mc Hill.
- A.O.A.C (Association Official Analytical Chemist) (1984). **Determinación de la humedad**. Método 16.032. E.E.U.U.
- A.O.A.C. (1984). **Determinación de la acidez titulable**. Método 16.023. E.E.U.U.
- A.O.A.C (2000). **Determinación de grasa**. Método Soxhlet 31.4.02. E.E.U.U.
- A.O.A.C. (2000). **Determinación de proteínas por micro Kjeldahl**. Método 12.1.07. E.E.U.U.
- BAQUEIRO, I. (2004). “**Determinación de la actividad proteolítica de bacterias utilizadas como probióticos presentes en leches fermentadas comerciales**”. México D.F. Tesis para obtener el grado de especialista en biotecnología. Facultad de ciencias biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- BLÁSICO, M. (1999). “**Kéfir un yogurt para rejuvenecer**”. Editorial Grupo océano S.A. Barcelona-España.
- BUTEL, M. et al. (1998) “**Clostridial pathogenicity in experimental necrotizing enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of Bifidobacteria**”. Journal of medical Microbiology, MEXICO.
- CASTAÑEDA, B. (2008). “**Probiótico elaborado en base a las semillas de *Lupinus mutabilis sweet* (chocho o tarwi)**”. Tesis para obtener el grado de magister en biotecnología alimentaria. Universidad Agraria la Molina. Lima – Perú.

- **CASTRO, W. (2007). "Manual de prácticas de análisis de productos agroindustriales".** Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, EDIT. Compugraph. Tercera edición. Chachapoyas- Perú.
- **CODEX TANDARD 243 (2003). Norma del Codex para leches fermentadas.**
- **DONCKERS, R. (2010). "Tecnología productiva de lácteos, calidad de la leche".** Perú.: Ed. Solid OPD.
- **FLORES, I. (2008). "Nutrición industrial".** Editorial Grupo océano S.A. Barcelona, España.
- **FAGGELLA, R. (2004). "Elaboración y red de distribución de kéfir en Argentina".** 4ta edición. Edit. kenira S.A-República de Argentina. Buenos Aires, Argentina.
- **FORSYTHE, J. (2003). "Alimentos Seguros: Microbiología".** Zaragoza: Acribia.
- **FRANCO, M. (2008) "kéfir" (en línea).** Consultado el 03 de abril del 2011. Zaragoza-España. Disponible en: <http://www.lanaturalezanet.net/bdkefir.htm>
- **GARCIA, F. (2007) "Manual de microbiología agroindustrial".** Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.Edit. Compugraph. S.R.L. Chachapoyas – Peru.
- **GARROTE, G.2000. "bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kéfir".** Argentina. Tesis doctoral. Facultad de biotecnología industrial. Universidad nacional de la plata.
- **GOMEZ, L. (2009). "Lácteos la Cruz; empresa productora de derivados lácteos".** Edit. Grupo océano S.A. Barcelona-España.
- **GUERRERO, D. (2005), " Produccion de leche fermentada utilizando bacterias probioticas (lactobacillus acidophilus, bifidobacterium lactis y streptococcus thermophilus) con leche de cabra y vaca".** Perú. Tesis para optar el grado académico de: Magister en biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- **GUINEE, ET. AL (1995) "Physical properties of stirred-curd unsweetened yogurts stabilized with different dairy ingredients".** Milchwissensch.

- GUTIERREZ, N, y otros (2008). **“efecto del porcentaje de inculo y del tiempo de incubacionn sobre las características físico-químicas del kefir”**. Centro de investigación en ciencia y tecnología de alimentos. Universidad autónoma del Estado Hidalgo.
- HONER, C. (1993). **“Nuevo kéfir”**. Editorial RBA ediciones. Barcelona, España.
- INDECOPI (Instituto Nacional de defensa de la competencia y de la protección de la propiedad intelectual) (2003): **Normas Técnicas Nacionales: Leche cruda: requisitos; NTP 202.001**. Lima – Perú.
- INDECOPI (1998c). NTP 202.008. **Determinación de la densidad de la leche: Método usual**. Lima- Perú.
- INDECOPI (1998c). NTP 202.009. **Determinación de la acidez de la leche**. Lima- Perú.
- INDECOPI (1998). NTP 202 018. **Determinación de la humedad, sólidos totales**. Método usual. Lima – Perú.
- INDECOPI (1998). NTP 202. 030. **Prueba del alcohol para leche fresca**. Lima – Perú.
- INDECOPI (1998). NTP 202.014. **Prueba del azul de metileno en leche**. Lima – Perú.
- INDECOPI (1998). NTP 202.180. **Determinación de la gravedad específica de la leche**. Método del picnómetro. Lima – Peru.
- INDECOPI (2003). **Recuento de aerobios mesófilos en leche cruda**. Lima – Perú-
- INDECOPI (1991). NTP 202.083. **Recuento de coliformes totales**. Lima- Perú.
- KIRK, R. y Otros. (1996). **“Composición y Análisis de Alimentos de pesaron”**. (2ª ed.) . compañía editorial continental S. A. México.
- MARTINEZ, (2001). **“Cerveza sin alcohol: sus propiedades”**. Sociedad española de dietética y ciencia de la alimentación. Edit. Acribia S.A. Barcelona, España.
- MENDO, M. (2005). **“Medios de cultivo en microbiología: manual de laboratorio”**. quinta edición. Edit. Ediciones laborales S.R.L. Lima – Perú.

- MERCOSUR (1997) “**Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca, Reglamento técnico Mercosur de identidad y calidad de leches fermentadas**”, Montevideo, Uruguay.
- MIQUEL, E. (2001). “**El kefir de leche**”. (en línea). Consultado el 20 de marzo de 2011. España. Disponible en:  
<http://www.naturalred.com/conocimiento/articulos/kefir.htm>
- MONTGOMERY, D. (2004). “**Diseño y análisis de experimentos**”. Edit. Limusa Wiley. Segunda edición. Mexico.
- PALENCIA, Y. (2004) “**Los alimentos lácteos y sus limitaciones**” (en línea). Consultado el 28 de marzo de 2011. Zaragoza, España. Disponible en:  
[http://www.unizar.es/med\\_naturista/Lacteos.pdf](http://www.unizar.es/med_naturista/Lacteos.pdf).
- PANREAC QUIMICA, S.A. (2005). “**Métodos analíticos en alimentaria métodos oficiales de análisis: leche y productos lácteos**”. España.
- PAREZ, R. y JUAREZ, A. “**Bioquímica de los microorganismos**”. Edit. Reverté S.A. Barcelona- España.
- PEÑA, D. (2002). “**Regresión y diseño de experimentos**”. Alianza editorial Ciencias Sociales. Madrid – España.
- PEREZ, J. (1984). “**Factores Tecnológicos de la producción y utilización de iniciadores**”. En: Perez, G. J. Bioquímica y Microbiología de la leche. Edit. Limusa. Mexico.
- PEREZ, M. (2008). “**Kéfir de leche, y su beneficio nutritivo**”. 3ra edición. Editorial grupo Océano S.A. Barcelona, España.
- RALPH, E. (2000). “**Tecnología de los productos lácteos**”. Edit. Acribia S.A. Zaragoza – España.
- TAMIME, A; ROBINSON, R. (1985), “**yoghurt: science and technology**”. Pergamon Press”. Gran Bretaña.

- UREÑA, M;D ARRIGO, M. (1999). “Evaluación sensorial de los alimentos”. Editorial Agraria. Lima, Perú.
- VARNAN, A. y SUTHERLAND, P. (1995). “Tecnología de la Leche y Productos Lácteos”. Zaragoza: Acribia S.A.
- WALSTRA, P. GEURTS, T. Y OTROS. (2001). “Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos”. Zaragoza: Acribia.
- VEISSEYRE, R.(1986). “Lactología Técnica”. España: Ed. Acribia.
- ZITTLAU, J. (2003). “El gran libro del Kéfir”. Zaragoza – España; Acribia S.A.

## **VIII. ANEXOS**

## ANEXO N° 01

### **METODOS PARA EL ANALISIS FISICOQUIMICO DE LA MATERIA PRIMA (LÉCHE).**

#### **1. Densidad**

Se determino de acuerdo al metodo usual dado por NTP 202.008. (INDECOPI, 1998c) donde se siguió los pasos siguientes:

Se vertió 500 ml de leche en una probeta por las paredes del mismo, sin hacer espuma. Luego se colocó suavemente el lactodensímetro (calibrado a 15°C, y que lleva incorporado un termómetro de 0 a 100°C) dentro de la probeta, dejándolo flotar. Y cuando estuvo en reposo se hizo la lectura, tanto de la densidad como de la temperatura de la muestra, para su posterior corrección.

Para la corrección de la lectura dada por el lactodensímetro, teniendo en cuenta la temperatura de la muestra, se tuvo en consideración lo siguiente:

- ✓ Por cada grado centígrado sobre 15 °C, aumentar 0.2
- ✓ Por cada grado centígrado bajo 15 °C, disminuir 0.2

Por ejemplo, el lactodensímetro indica 26 a la temperatura de 25 °C. Corrección es:

$26 + (10 \times 0.2) = 26 + 2 = 28$  entonces la densidad será: 1.028 kg/l

#### **2. Determinación de la acidez (° Dornic)**

Se determinó de acuerdo al método NTP 202.009 (INDECOPI, 1998c), teniendo la siguiente secuencia:

Se colocó 9 ml de leche en el vaso de precipitado de 50ml; incorporándole tres gotas de fenolftaleína al 1 %. Por otro lado se llenó la bureta con la solución de NaOH al 0.1 N. Luego se empezó a titular, hasta tener un color rosado, terminándose la titulación cuando esta coloración se mantuvo por unos 30 segundos aproximadamente.

El resultado fue expresado en grados dornic, teniendo en cuenta la siguiente relación:

Décima de ml de NaOH utilizados = acidez en grados dornic.

### **3. Determinación de pH.**

Se utilizó el pH-metro digital. Marca QUIMIS. Modelo Q400MT ; utilizado por Castro, (2007). Teniendo en cuenta el siguiente procedimiento:

Primeramente se realizó la calibración del el pH-metro, con buffer a pH = 4 y pH = 7. Y lavándolo el electrodo y sensor de temperatura de pH-metro con agua destilada.

Por otro lado se colocó la muestra de leche en un vaso de precipitación de 50ml. Donde el valor se obtuvo introduciendo directamente el electrodo y el sensor de temperatura dentro muestra.

### **4. Determinación de la humedad y sólidos totales.**

Se determinó por el método usual, NTP 202.018 (INDECOPÍ; 1998). Método 16.032 (A.O.A.C; 1984). Y utilizado por Castro (2007). Que consiste en lo siguiente:

Pesamos la placa Petri (W1), luego agregamos la muestra de leche, y pesamos nuevamente con la muestra incluida (W2). Posteriormente colocamos en la estufa a una temperatura de 110 °C, controlando el peso cada 30 minutos, enfriando en un desecador hasta obtener peso constante (W3).

Los resultados se obtuvieron por diferencia de pesos, guiándonos en la siguiente fórmula:

$$\text{➤ \%HUMEDAD} = \left[ \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \right] \times 100$$

$$\text{➤ \%SOLIDOS TOTALES} = 100 - \%Humedad$$

### **5. Determinación de grasa.**

Se determinó por el método 31.4.02 (A.O.A.C, 2000). Y utilizado por Castro, 2007. De acuerdo a la siguiente secuencia:

El contenido de grasa fue determinado por el método de Soxhlet, que consistió en pesar el balón frío (P1), luego poner 5 g (P2), de muestra seca (obtenido en la determinación de humedad y sólidos totales) en papel filtro y se colocó el paquete en el cuerpo del aparato

Soxhlet, previamente montado, se añadió como disolvente 150 ml de éter de petróleo. Se encendió el equipo y se dejó hervir por un lapso de 8 horas aproximadamente. Pasado este tiempo se desmontó el equipo y se puso el balón a la fuente de calor para que se evapore el éter sobrante. Luego se colocó en la campana de desecación, para posteriormente ser pesado el balón con la muestra residual (P3). El resultado se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%Grasa = \left[ \frac{P3 - P1}{P2} \right] \times 100$$

#### **6. Prueba de alcohol.**

Se hizo teniendo en cuenta la norma NTP 202.030 (INDECOPI, 1998) y mencionado por Veisseyre (1986) en su libro "Lactología técnica" teniendo el siguiente procedimiento:

Se colocó en un tubo de ensayo 2 ml de leche al cual se le adicionó 2 ml de alcohol etílico 68%, luego se le fue agitando suavemente. Los resultados fueron obtenidos de acuerdo a la reacción que se observó en la mezcla.

#### **7. Prueba del azul de metileno.**

Se hizo teniendo en cuenta la norma NTP 202.014 (INDECOPI, 1998) y mencionado por Veisseyre (1986) en su libro "Lactología técnica" teniendo el siguiente procedimiento:

- Primeramente se homogenizó las muestras agitándole manualmente unas 25 veces aproximadamente. Evitando que las muestras estén a exposición de la luz solar.
- Se tomó 5 ml de leche en un tubo estéril de 16 x150 cerrado con un tapón de goma, que fue esterilizado anteriormente en un autoclave, tratando de no mojar un costado de la pared interior del tubo.
- Se le añadió 0.1 ml de solución de azul de metileno, evitando que la pipeta no toque a la leche.
- Se volvió a tapar los tubos con el tapón de goma, luego se procedió a voltearlo unas dos veces para obtener una mezcla homogénea de la leche y el colorante.

- Posteriormente los tubos que contienen la muestra se colocó en un baño maría a 37 °C, teniendo en cuenta con precisión el momento de la inmersión y que el nivel de agua del baño maría debe sobrepasar al de la leche en el tubo.
- El control se hizo cada media hora, teniendo en consideración que los tubos decolorados se sacan del baño y se anota el tiempo en el que ha producido la decoloración.
- Para la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta la siguiente tabla:

**TABLA N° 25: Interpretación de los resultados del test del azul de metileno**

<b>Decoloración en:</b>	<b>Numero de bacterias por ml</b>	<b>Calidad de la leche</b>
<b>5 horas</b>	100000 - 200000	Buena
<b>2 a 4 horas</b>	200000 – a 2 millones	Buena a regular
<b>Menos de 2 horas</b>	2 a 10 millones	Insuficiente

Fuente: Lactología técnica (Veisseyre, 1986).

#### **8. Determinación de proteínas por micro kjeldahl.**

Se determinó de acuerdo al método 12.1.07 (A.O.A.C, 2000), La norma FIL-20:1962 y utilizado por Castro (2007). Teniendo la siguiente secuencia:

##### **Digestión:**

- Una vez encendido el equipo compacto de digestión MBC/02 y calibrada a 420 °C; se colocó dentro de cada tubo del equipo: 1 gr de muestra (w) + 5 gr de catalizador + 15 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- Se colocó el colector de humos y se encendió la campana extractora

- Se colocó los tubos al sistema calefactor cuando este alcanzo la temperatura de trabajo.
- Luego de espero un tiempo de 1 hora a que termine la digestión, observando que el material contenido en los tubos tienen un color verde esmeralda translucido, indicando así el final de la digestión.
- Luego se retiró los tubos del sistema calefactor para enfriar hasta aproximadamente unos 60 ° C, agregándole inmediatamente 75 ml de agua destilada y dejándole enfriar a temperatura ambiente.

#### **Destilación:**

- Se colocó uno por uno los tubos de muestra en el soporte del destilador de nitrógeno DNP – 2000.
- Por otro lado en un matraz de 250 ml se agregó 25 ml de solución (ácido bórico + indicador mixto) colocándole en la salida del digestor.
- Se programó 2 minutos el reloj controlador de NaOH y luego se presionó el botón START del equipo, agregándole automáticamente 80 ml de NaOH al tubo de muestra. Lo que pasado este tiempo se le regreso el reloj a cero.
- Luego se programó 8 minutos el reloj controlador de DESTILACION y se presionó el botón START del equipo, lo que automáticamente empezó la destilación de la muestra.
- El producto de destilación se recogió en el matraz que contiene 25 ml de solución, hasta un volumen de 150 ml, la que tomo una coloración verde claro.
- Luego se programó 10 minutos el reloj controlador de SÚCCIÓN y se presionó el botón START del equipo, lo que automáticamente empezó la succion del residuo contenido en el tubo de muestra.
- Después se llenó el tubo de muestra con agua destilada y se repitió el paso anterior.

- El matraz con el destilado se retiró para su titulación.

**Titulación:**

- Se llenó la bureta automática con HCl 0.25 N y se realizó la titulación hasta que se tenga un viraje de color palo rosa.
- Para el cálculo del porcentaje nitrógeno se tuvo la siguiente ecuación:

$$\% N = \frac{V * N * 0.014}{W} * 100$$

Donde:

N = Contenido de nitrógeno %

V = Volumen gastado de HCl, ml

W = Peso de la muestra en gr

- Para el cálculo del porcentaje de proteína se tuvo la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Proteína} = \%N * f$$

Donde:

f = factor para leche y productos lácteos (f = 6.38).

## ANEXO N° 02

### **TECNICAS PAR EL RECUESTO MICROBIOLOGICO: TANTO DE LA MATERIA PRIMA (LECHE) Y DEL PRODUCTO TERMINADO (BEBIDA FERMENTADA TIPO KEFIR).**

#### **1. Técnica del recuento en placa.**

Según Mendo (2005) en su libro en su libro “Medios de cultivo microbiológico: manual práctico de microbiología”. Y utilizado por García (2007) en su “manual práctico de microbiología agroindustrial”, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

El método de recuento en placa para determinar el número de bacterias o levaduras de una muestra se basa en la presunción de que cada célula bacteriana puede crecer en un medio de cultivo solido formando colonias.

De acuerdo a este criterio el número de colonias desarrolladas es un medio de cultivo sólido puede corresponder al número de células bacterianas viables presentes en una cantidad determinada de muestra que haya sido inoculada.

#### **Materiales y equipos**

- ✓ Placas Petri ( 100x 150mm)
- ✓ Pipetas bacteriológicas de 1.5 y 10 ml.
- ✓ Baños de agua regulada a 44-46 °C para mantener el agar licuado
- ✓ Incubadora regulada a 29-31 °C.
- ✓ Cuenta gérmenes .
- ✓ Agar Plate Count.
- ✓ Agar Saboraut
- ✓ Material biológico: leche y bebida fermentada tipo kefir

**Procedimiento:**

1. Preparar y diluir la leche y la bebida fermentada tipo kefir por la técnica adecuada.
2. Pipetear por duplicado a las placas estériles alícuotas de 1 ml a partir de la dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  para obtener una dilución de  $10^{-4}$  ml de muestra por placa Petri. Se sugiere esta serie de diluciones si no se conoce el rango aproximado del número de bacterias.
3. Agregar rápidamente a las placas Petri 15 ml de agar licuado y temperado. Entre la preparación y la adición del agar no debe transcurrir más de 10 minutos.
4. Mezclar inmediatamente las alícuotas con el agar mediante movimientos de vaivén y rotación de las placas Petri se pueden seguir los siguientes pasos:
  - a. Mover la placa de arriba abajo cinco veces en una dirección.
  - b. Rotar cinco veces la placa en sentido de las agujas del reloj.
  - c. Mover la placa cinco veces en la dirección que haga ángulo recto al usado en el primer tiempo.
  - d. Rotar cinco veces la placa en sentido inverso al de las agujas del reloj.
5. Como control de esterilidad, adicionar a placas Petri, agar sin inocular y agar inoculado con el diluyente,
6. Una vez solidificado el agar, invertir las placas e incubarlas a 29-31°C durante 48 +/- 3 horas.
7. Se hizo el recuento de la placa  $10^{-4}$  por que tuvo la cantidad de colonias más diferenciadas la que ayudarían su conteo de microorganismos, con un contador de colonias marca KUNKE GERBER.

## 2. Técnica del número más probable (NMP)

Según Mendo (2005) en su libro en su libro “Medios de cultivo microbiológico: manual práctico de microbiología”. Y utilizado por García (2007) en su “manual práctico de microbiología agroindustrial”, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Esta técnica se basa en la presunción de que las bacterias se hallan normalmente distribuidas en un medio líquido, esto es, que las muestras repetidas del mismo tamaño de un mismo producto, debe esperarse contengan el mismo número de gérmenes como promedio, naturalmente algunas de las muestras pueden contener algunos gérmenes más o menos. La cifra media es el número más probable. Si el número de gérmenes es grande, la diferencia entre las muestras serán pequeñas; todos los resultados individuales estarán próximos a la media.

Si el número de gérmenes es pequeño, las diferencias, hablando relativamente serán mayores.

Es posible calcular el número más probable de gérmenes/100ml. Con cualquier combinación de resultados obtenidos de tales muestras. Se han hecho tablas para muestras de 10 ml, 1 ml y 0.1 ml, utilizando cinco o tres tubos para cada tamaño de la muestra y, para determinaciones en agua, utilizando una muestra de 50 ml. La presencia de coliformes fecales y *Escherichia coli* se usa para indicar una contaminación potencialmente peligrosa por el hecho de que el hábitat natural de estos microorganismos son las heces humanas y de animales de sangre caliente.

### **Materiales y equipos**

- a. Incubadora a 35-37°C.
- b. Pipetas bacteriológicas de 1 ml.
- c. Asa de siembra
- d. Medio de Cultivo:

Caldo verde brillante (Caldo Brilla), volúmenes de 10 ml en tubos de 150x15 mm, conteniendo tubos de fermentación invertidos (75x10mm).

e. Material Biológico: leche y bebida fermenta tipo Kefir

### **Procedimiento**

1. Se preparó la muestra de leche y de bebida fermentada tipo kefir según la técnica ya descrita para su preparación y dilución.
2. Se pipeteo 0.5 ml de cada muestra de kefir para agregar a los tubos que contenían 4 ml de agua destilada para luego homogeneizarla.
3. Sacamos de la dilución obtenida en el apartado (2), 1 ml para agregar a los tres tubos que contienen caldo brilla.
4. Se realizó en total 9 diluciones cada dilución se hizo con tres tubos los cuales fueron:
  - ✓ Tres tubos con  $10^{-1}$ .
  - ✓ Tres tubos con  $10^{-2}$ .
  - ✓ Tres tubos con  $10^{-3}$ .
5. Incubamos los tubos a 35-37°C por 24 horas.
6. Anotamos los tubos que contenían producción de gas.
7. Luego se verifico con la tabla del NMP para expresar así el resultado obtenido.

### ANEXO N° 03

#### **MÉTODOS DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LA BEBIDA FERMENTADA TIPO KEFIR.**

##### **1. Determinación de la densidad.**

La medición de esta propiedad, se determinó por el método gravimétrico utilizando picnómetro NTP 202.180 (INDECOPI, 1998) teniendo el siguiente proceso:

Se pesó el picnómetro vacío, luego se pesó el picnómetro con agua destilada y el picnómetro con la bebida fermentada tipo kefir. Tener en cuenta que tanto el agua como la bebida fermentada estuvieron a temperaturas iguales, que en este caso fue de 20 °C.

La densidad relativa de la bebida fermentada tipo kefir se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$\rho_r, bebida = \frac{\text{Peso (pic + kefir)} - \text{Peso (pic vacío)}}{\text{Peso (pic + agua)} - \text{Peso (pic vacío)}}$$

Como cuando se pesa el picnómetro vacío, se tiene que realmente no está vacío sino que contiene aire, por lo que para calcular la densidad de la bebida fermentada se tuvo que considerar la densidad del aire (0.001293 gr/cm<sup>3</sup>) y la densidad del agua destilada a la temperatura de 20 °C (0.998230 gr/cm<sup>3</sup>) (Tabla N° 35).

Por tanto para obtener la densidad corregida de la bebida fermentada tipo kefir se tiene la siguiente ecuación:

$$\rho_c, bebida = \rho_r (DA - da) + da$$

Donde:

$\rho_c$  = Densidad corregida de la bebida fermentada tipo kefir.

$\rho_r$  = Densidad relativa de la bebida fermentada tipo kefir resultado de la ecuación anterior.

DA = Densidad del agua a la temperatura de estudio

da = Densidad promedio del aire

**TABLA N° 26:** Valores de densidad del agua de acuerdo a la temperatura.

	Temperatura ° C						
	0	5	10	15	20	25	30
$\rho(\text{gr}/\text{cm}^3)$	0.999868	0.999992	0.999727	0.999126	0.998230	0.997071	0.995673

Fuente: laboratorio N° 4 determinación de densidad (Valderrama, 2007).

## 2. Determinación de la acidez titulable.

Se determinó de acuerdo al método 16.023 (A.O.A.C, 1984). Basado en una titulación con NaOH 0.1 N, donde se colocaron aproximadamente 1 gr de muestra en un vaso de precipitación de 50 ml, posteriormente se añadió 9 ml de agua destilada y se agitó vigorosamente, se incorporaron tres gotas de fenolftaleína al 1 % y se tituló con NaOH 0.1 N, hasta obtener una coloración rosada. La acidez se expresó como porcentaje de ácido láctico, teniendo en cuenta la siguiente relación:

1ml de NaOH 0.1N = 0.009gr de ácido láctico.

El porcentaje de acidez se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(\text{ml de NaOH}) * (\text{N de NaOH}) * 0.09}{\text{gr de muestra}} * 100$$

## 3. Determinación de pH :

Se utilizó el pH-metro digital. Marca QUIMIS. Modelo Q400MT ; utilizado por Castro, (2007). la descripción se muestra en el anexo N° 01 inciso 3.

#### **4. Determinación del porcentaje de sinéresis:**

La sinéresis se determinó sobre la base de la técnica Guinee et al, (1995). Se pesaron 6 gr de bebida fermentada tipo kefir a 20 ° C en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 4500 rpm. Durante 20 minutos. El peso del sobrenadante obtenido se empleó para calcular el porcentaje de sinéresis mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{sinéresis} = \frac{\text{Pesodelsobenadante}}{\text{Pesodelamuestra}} * 100$$

#### **5. Determinación de la viscosidad aparente:**

Se determinó empleando el viscosímetro rotacional, Marca NAHITA. Modelo 801. En donde se tomaron mediciones a velocidades de 30 y 60 rpm, utilizando el rotor N° 3. En muestras de 400 ml de bebida fermentada tipo kefir.

#### **6. Determinación del porcentaje de alcohol.**

Se determinó utilizando el método de la diferencia de densidades (Martínez, 2001) teniendo la siguiente secuencia:

Se tiene la densidad inicial (D1) calculado por el método del picnómetro, en la etapa de acondicionamiento de temperatura antes de la fermentación.

La densidad final (D2) se obtuvo terminada la fermentación también calculada por el método del picnómetro.

Para obtener el porcentaje de alcohol se tuvo la siguiente ecuación:

$$\% \text{Alcohol} = (D1 - D2) * 105 * 1.25$$

## ANEXO N° 04

### MODELO ESTADÍSTICO PARA UN DISEÑO FACTORIAL $2^2$

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + u_{ij} \quad i=1,2; j=1,2$$

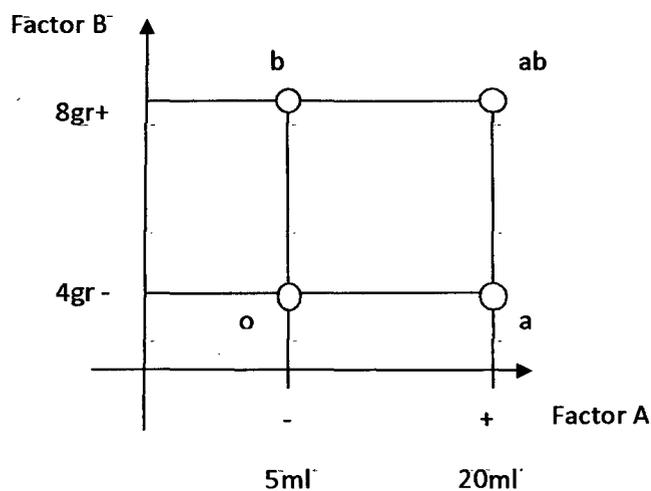
Dónde:

$\mu$  = Es la media de todas las observaciones

$\alpha_i$  = Efecto de A (Cultivo de yogurt)

$\beta_j$  = Efecto de B (Fermento de chicha artesanal)

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción AB (Interacción del cultivo de yogurt con el fermento de chicha artesanal).



**Figura N° 21:** Estructura del diseño factorial  $2^2$ .

Dónde:

a = suma total del tratamiento A alto, B bajo

b = suma total del tratamiento A bajo, B alto

ab = suma total del tratamiento A alto, B alto

o = suma total del tratamiento A bajo, B bajo

n = número de repeticiones

**Estimación:** De la gráfica se tiene los estimadores  $\hat{\mu}, \hat{\alpha}, \hat{\beta}$  y  $(\hat{\alpha}\hat{\beta})$ , de los parámetros de los cuales para su cálculo se tiene:

$$\hat{\mu} = \frac{1}{4}(o + a + b + ab)$$

$$\hat{\alpha} = \frac{1}{2n}(a + ab - b - o)$$

$$\hat{\beta} = \frac{1}{2n}(b + ab - a - o)$$

$$(\hat{\alpha}\hat{\beta}) = \frac{1}{2n}(ab + o - a - b)$$

**Análisis de varianza para el experimento**

- **Suma de cuadrados**

**Suma de cuadrados del factor A (Cultivo de yogurt)**

$$SS_{\alpha} = \frac{[ab + a - b - o]^2}{4n}$$

**Suma de cuadrados del factor B (Fermento de chicha artesanal)**

$$SS_{\beta} = \frac{[ab + b - a - o]^2}{4n}$$

**Suma de cuadrados de la interacción del factor A con el factor B**

$$SS_{\alpha\beta} = \frac{[ab + o - a - b]^2}{4n}$$

**Suma de cuadrados del total**

$$SS_T = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^n y_{ijk}^2 - \frac{y_{...}^2}{4n}$$

**Suma de cuadrados del error**

$$SS_E = SS_T - SS_A - SS_B - SS_{AB}$$

**TABLA N° 27: Análisis de varianza para un experimento aplicando un diseño factorial  $2^2$ .**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	$F_{calculado}$	<b>Valor P</b>
<b>A</b>	$SS_{\alpha}$	1	$\frac{SS_{\alpha}}{GL}$	$\frac{CM_{\beta}}{CM_E}$	
<b>B</b>	$SS_{\beta}$	1	$\frac{SS_{\beta}}{GL}$	$\frac{CM_{\alpha}}{CM_E}$	
<b>AB</b>	$SS_{\alpha\beta}$	1	$\frac{SS_{\alpha\beta}}{GL}$	$\frac{CM_{\alpha\beta}}{CM_E}$	
<b>ERROR</b>	$SS_E$	$4(n-1)$	$\frac{SS_E}{GL}$		
<b>TOTAL</b>	$SS_T$	$4n-1$			

**Fuente:** Diseño y análisis de experimentos (Montgomery, 2004).

## ANEXO N° 05

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE ACEPTACIÓN.**

Para la evaluación sensorial de aceptación se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), cuya fórmula es la siguiente:

#### **Modelo aditivo lineal**

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

#### **Donde:**

i = del 1 al 4

j = del 1 al 30

#### **Además:**

$Y_{ij}$  : Es la evaluación sensorial (sabor, aroma, color y consistencia) en el i-ésimo tratamiento y j-ésimo panelista.

$\mu$  : Es el efecto de la media general.

$\tau_i$  : Es el efecto de i-ésimo tratamiento de la bebida fermentada tipo kefir

$\beta_j$  : Es el efecto del j-ésimo panelista.

$\varepsilon_{ij}$  : Es el efecto del error experimental observado en el i-ésimo tratamiento, en el j-ésimo panelista.

Para lo cual se planteó la siguiente hipótesis estadística:

$H_0 =$  La concentración de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal influyen de manera significativa sobre la aceptación de la bebida fermentada tipo kefir en cuanto a sus características: Aroma, Sabor, Color y Consistencia.

$H_1 =$  La concentración de cultivo de yogurt y fermento de chicha artesanal no influyen de manera significativa sobre la aceptación de la bebida fermentada tipo kefir en cuanto en cuanto a sus características: Aroma, Sabor, Color y Consistencia.

### **Prueba de comparaciones múltiples**

Para las comparaciones múltiples se empleó la prueba contraste múltiple de rangos, método del 95 porcentaje de LSD.

**ANEXO N° 06**

**ANALISIS ESTADISTICO PARA LOS RESULTADOS DE LAS  
CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LA BEBIDA FERMENTADA TIPO  
KEFIR.**

**1) EFECTOS ESTIMADOS PARA PH**

Promedio = 4.49125 +/- 0.0351596

A:A = -0.095 +/- 0.0703192

B:B = -0.065 +/- 0.0703192

AB = -0.0525 +/- 0.0703192

Los errores estándar están basados en un error total con 12 g.l.

**TABLA N° 28: Análisis de la Varianza para pH**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:A	0.0361	1	0.0361	1.83	0.2016
B:B	0.0169	1	0.0169	0.85	0.3735
AB	0.011025	1	0.011025	0.56	0.4697
Error Total	0.23735	12	0.0197792		
<hr/>					
Total (corr.)	0.301375	15			

R-cuadrado = 21.2443 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 1.55537 por ciento

Error Estándar de Est. = 0.140638

Error absoluto de la media = 0.0965625

Estadístico Durbin-Watson = 1.01685 (P=0.0489)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0.429956

**Coefficiente de regresión para pH**

A:A = 0.00416667

B:B = 0.005625

AB = -0.00175

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{pH} = 4.53667 + 0.00416667 * A + 0.005625 * B - 0.00175 * A * B$$

Siendo los valores de las variables especificados en sus unidades originales.

## 2. Efectos estimados para la producción de acidez (% de ácido láctico).

Promedio = 0.73 +/- 0.010013

A:A = 0.0125 +/- 0.020026

B:B = -0.085 +/- 0.020026

AB = -0.0975 +/- 0.020026

Los errores estándar están basados en un error total con 12 g.l.

**TABLA N° 29:** Análisis de la Varianza para producción de acidez (% ácido láctico)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:A	0.000625	1	0.000625	0.39	0.5442
B:B	0.0289	1	0.0289	18.02	0.0011
AB	0.038025	1	0.038025	23.70	0.0004
Error Total	0.01925	12	0.00160417		
Total (corr.)	0.0868	15			

R-cuadrado = 77.8226 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 72.2782 por ciento

Error Estándar de Est. = 0.040052

Error absoluto de la media = 0.0290625

Estadístico Durbin-Watson = 2.18929 (P=0.4582)

Autocorrelación residual Lag 1 = -0.111039

### **Coefficiente de regresión para producción de acidez (%de ácido láctico)**

Constante = 0.603333

A:A = 0.0203333

B:B = 0.019375

AB = -0.00325

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\%acidez = 0.603333 + 0.0203333*A + 0.019375*B - 0.00325*A*B$$

### 3. Efecto estimado de la viscosidad aparente (Cp.)

Promedio = 218.938 +/- 3.71424

A:A = 105.125 +/- 7.42848

B:B = -115.875 +/- 7.42848

AB = -57.125 +/- 7.42848

Los errores estándar están basados en un error total con 12 g.l.

**TABLA N° 30: Análisis de la Varianza de la viscosidad aparente (Cp.)**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:A	44205.1	1	44205.1	200.27	0.0000
B:B	53708.1	1	53708.1	243.32	0.0000
AB	13053.1	1	13053.1	59.14	0.0000
Error Total	2648.75	12	220.729		
Total (corr.)	113615.0	15			

R-cuadrado = 97.6687 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 97.0858 por ciento

Error Estándar de Est. = 14.857

Error absoluto de la media = 10.3125

Estadístico Durbin-Watson = 1.84311 (P=0.4816)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0.0268995

#### **Coefficiente de regresión de la viscosidad aparente (cp.)**

Constante = 162.333

A:A = 18.4333

B:B = -5.16667

AB = -1.90417

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Viscosidad (Cp.)} = 162.333 + 18.4333*A - 5.16667*B - 1.90417*A*B$$

#### 4. Efectos estimados para el % de sinéresis

Promedio = 61.2556 +/- 0.507709

A:A = -2.47875 +/- 1.01542

B:B = 1.32625 +/- 1.01542

AB = 0.23125 +/- 1.01542

Los errores estándar están basados en un error total con 12 g.l.

**TABALA N° 31:** Análisis de la Varianza para % de sinéresis

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:A	24.5768	1	24.5768	5.96	0.0311
B:B	7.03576	1	7.03576	1.71	0.2160
AB	0.213906	1	0.213906	0.05	0.8237
Error Total	49.4915	12	4.12429		
Total (corr.)	81.318	15			

R-cuadrado = 39.1383 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 23.9229 por ciento

Error Estándar de Est. = 2.03084

Error absoluto de la media = 1.3925

Estadístico Durbin-Watson = 0.891477 (P=0.0260)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0.480685

#### **Coefficiente de regresión para % de sinéresis**

Constante = 61.91

A:A = -0.2115

B:B = 0.235208

AB = 0.00770833

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ de sinéresis} = 61.91 - 0.2115*A + 0.235208*B + 0.00770833*A*B$$

## 5. Efectos estimados para la producción de % de alcohol

Promedio = 0.803801 +/- 0.0290313

A:A = -0.460423 +/- 0.0580627

B:B = 0.691585 +/- 0.0580627

AB = -0.28097 +/- 0.0580627

Los errores estándar están basados en un error total con 12 g.l.

**TABLA N° 32:** Análisis de la Varianza para la producción del % de alcohol

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:A	0.847956	1	0.847956	62.88	0.0000
B:B	1.91316	1	1.91316	141.87	0.0000
AB	0.315777	1	0.315777	23.42	0.0004
Error Total	0.161821	12	0.0134851		
Total (corr.)	3.23871	15			

R-cuadrado = 95.0035 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 93.7544 por ciento

Error Estándar de Est. = 0.116125

Error absoluto de la media = 0.0866747

Estadístico Durbin-Watson = 0.871056 (P=0.0232)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0.440041

### **Coefficiente de regresión para la producción de % alcohol**

Constante = -0.552316

A:A = 0.0254992

B:B = 0.289967

AB = -0.00936567

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{Alcohol} = -0.552316 + 0.0254992 * A + 0.289967 * B - 0.00936567 * A * B$$

## ANEXO N° 07

### **RESULTADOS GENERALES DEL ANALISIS SENSORIAL DE ACEPTACION DE ACUERDO A LAS CARACTERISTICAS EVALUADAS (AROMA, SABOR, COLOR Y CONSISTENCIA).**

#### **1. Evaluación del aroma**

**TABLA N° 33:** Resultado general del panel evaluado para la característica aroma, de los diferentes tratamientos efectuados.

PANELISTAS	Códigos de cada tratamiento			
	5c ; 4f	20c; 4f	5c; 8f	20c; 8f
	<b>13</b>	<b>62</b>	<b>31</b>	<b>120</b>
1	5	3	4	4
2	3	4	3	3
3	5	5	5	5
4	4	3	3	3
5	3	3	3	3
6	5	5	5	5
7	5	3	2	3
8	2	2	3	4
9	4	3	4	4
10	3	4	3	4
11	4	3	4	3
12	4	4	4	4
13	3	4	4	4
14	3	4	4	3
15	3	4	3	4
16	4	4	4	4
17	3	3	2	3
18	4	4	3	4
19	3	4	3	3
20	3	3	2	3
21	5	4	3	5
22	3	3	5	4
23	3	4	4	4
24	4	3	3	5
25	5	3	3	3
26	3	3	2	3
27	2	4	4	4
28	4	4	3	4
29	3	3	3	3
30	5	4	4	4
<b>TOTAL</b>	<b>110</b>	<b>107</b>	<b>102</b>	<b>112</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>3,66666667</b>	<b>3,56666667</b>	<b>3,4</b>	<b>3,73333333</b>

## 2. Evaluación del sabor:

**TABLA N° 34:** Resultado general del panel evaluado para la característica sabor, de los diferentes tratamientos efectuados.

PANELISTAS	Códigos de cada tratamiento			
	5c; 4f	20c; 4f	5c; 8f	20c; 8f
	13	62	31	120
1	5	3	4	4
2	3	4	3	3
3	4	4	4	4
4	4	3	3	2
5	3	3	4	4
6	5	5	4	5
7	5	3	3	4
8	2	3	4	5
9	4	3	4	2
10	4	4	3	3
11	4	2	4	3
12	5	2	3	4
13	3	4	3	4
14	4	5	3	4
15	3	4	3	3
16	4	4	5	3
17	3	3	3	4
18	3	4	4	3
19	3	5	3	3
20	2	2	3	4
21	4	3	4	3
22	4	4	4	2
23	3	4	3	4
24	5	3	3	3
25	3	5	3	3
26	4	2	5	5
27	4	2	3	4
28	5	5	4	5
29	3	2	4	3
30	4	3	3	4
<b>TOTAL</b>	<b>112</b>	<b>103</b>	<b>106</b>	<b>107</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>3,73333333</b>	<b>3,43333333</b>	<b>3,53333333</b>	<b>3,56666667</b>

### 3. Evaluación del color:

**TABLA N° 35:** Resultado general del panel evaluado para la característica color, de los diferentes tratamientos efectuados.

PANELISTAS	Códigos de cada tratamientos			
	5c; 4f	20c; 4f	5c; 8f	20c; 8f
	13	62	31	120
1	5	4	4	4
2	4	4	3	3
3	4	4	4	4
4	3	3	3	3
5	4	4	4	4
6	5	4	5	5
7	5	3	4	3
8	3	3	3	3
9	3	3	3	3
10	5	5	5	5
11	4	4	4	4
12	5	4	4	4
13	5	5	5	5
14	3	4	4	3
15	4	5	4	4
16	4	4	4	4
17	4	4	4	4
18	4	2	4	2
19	3	4	3	3
20	5	5	3	3
21	4	5	5	5
22	4	4	4	4
23	3	4	3	3
24	3	3	3	5
25	4	3	4	3
26	4	4	4	2
27	4	4	4	3
28	5	3	4	4
29	4	3	4	5
30	3	3	4	4
<b>TOTAL</b>	120	114	116	111
<b>PROMEDIO</b>	4	3,8	3,86666667	3,7

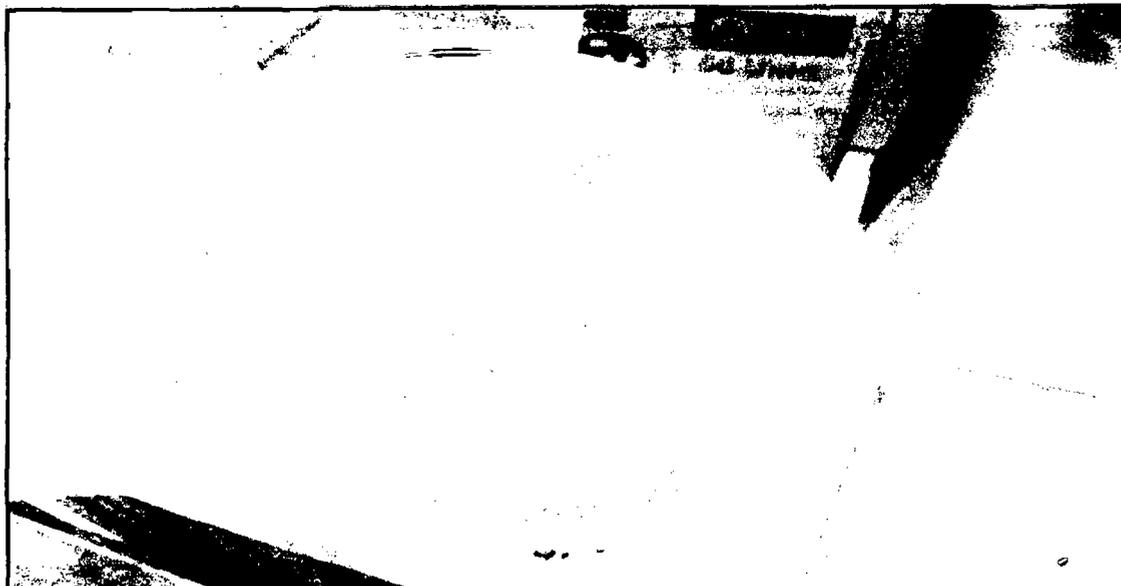
**4. Evaluación de la consistencia:**

**TABLA N° 36:** Resultado general del panel evaluado para la característica consistencia, de los diferentes tratamientos efectuados.

PANELISTAS	Códigos de cada tratamiento			
	5c; 4f	20c; 4f	5c; 8f	20c; 8f
	13	62	31	120
1	4	4	3	4
2	4	5	4	2
3	3	4	4	3
4	3	3	3	2
5	4	3	3	3
6	5	5	5	4
7	5	3	3	4
8	2	2	2	2
9	3	4	3	2
10	4	4	4	4
11	4	4	4	4
12	5	2	4	3
13	3	3	3	4
14	3	4	4	3
15	3	2	3	3
16	3	4	3	3
17	3	3	3	4
18	2	4	2	3
19	3	5	3	2
20	3	4	4	3
21	2	2	3	2
22	3	2	2	3
23	2	3	3	3
24	4	4	3	4
25	5	4	2	3
26	4	3	5	2
27	4	3	3	3
28	3	3	3	4
29	3	3	4	3
30	4	3	2	2
<b>TOTAL</b>	103	102	97	91
<b>PROMEDIO</b>	3,43333333	3,4	3,23333333	3,03333333

**ANEXO N° 08**

**FOTOS OBTENIDAS DURANTE LA EJECUCION DEL PROYECTO**



**FOTO N° 01: Fermento de chicha artesanal**



**FOTO N° 02: Determinación de la densidad del producto por el método del picnómetro.**



**FOTO N° 03: Midiendo el pH de nuestro producto (kefir).**



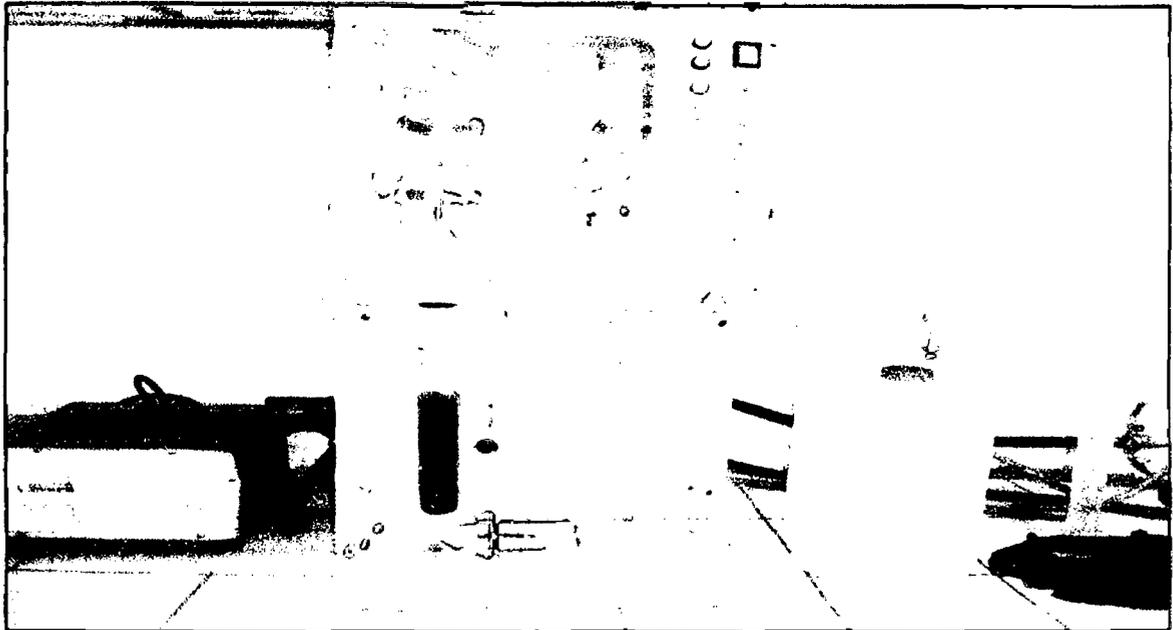
**FOTO N° 04: Realizando mediciones tanto de pH como de viscosidad.**



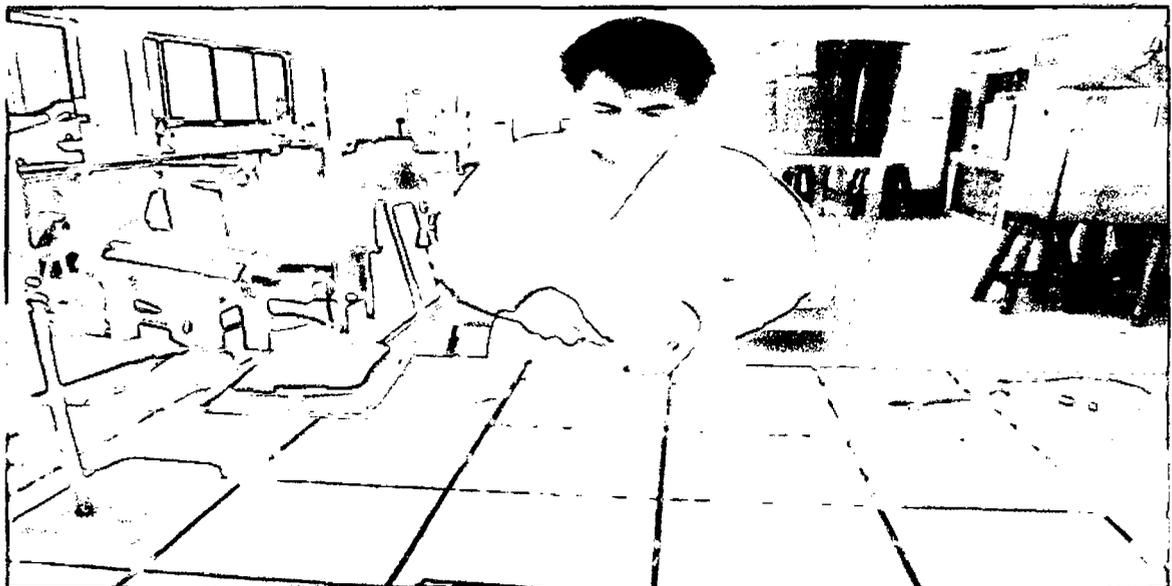
**FOTO N° 05: Utilizando la centrifuga para determinar sinéresis en el kefir.**



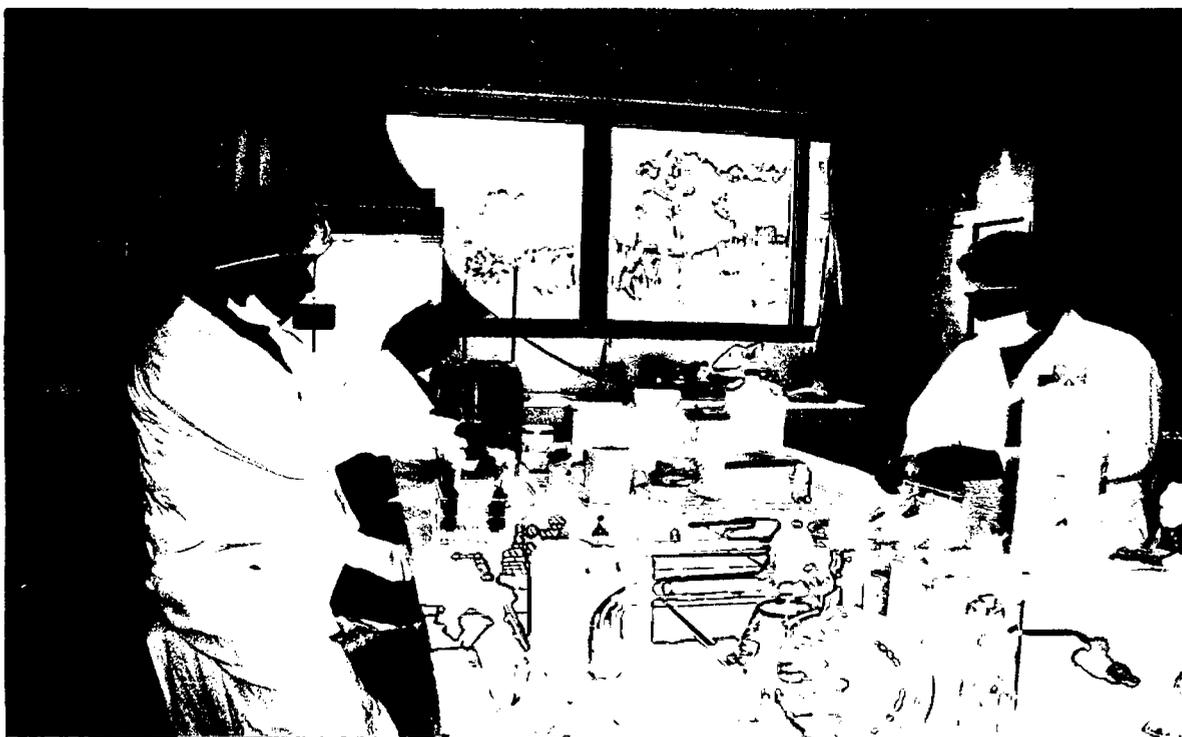
**FOTO N° 06: Preparando muestras con ácido bórico para determinar % de proteínas.**



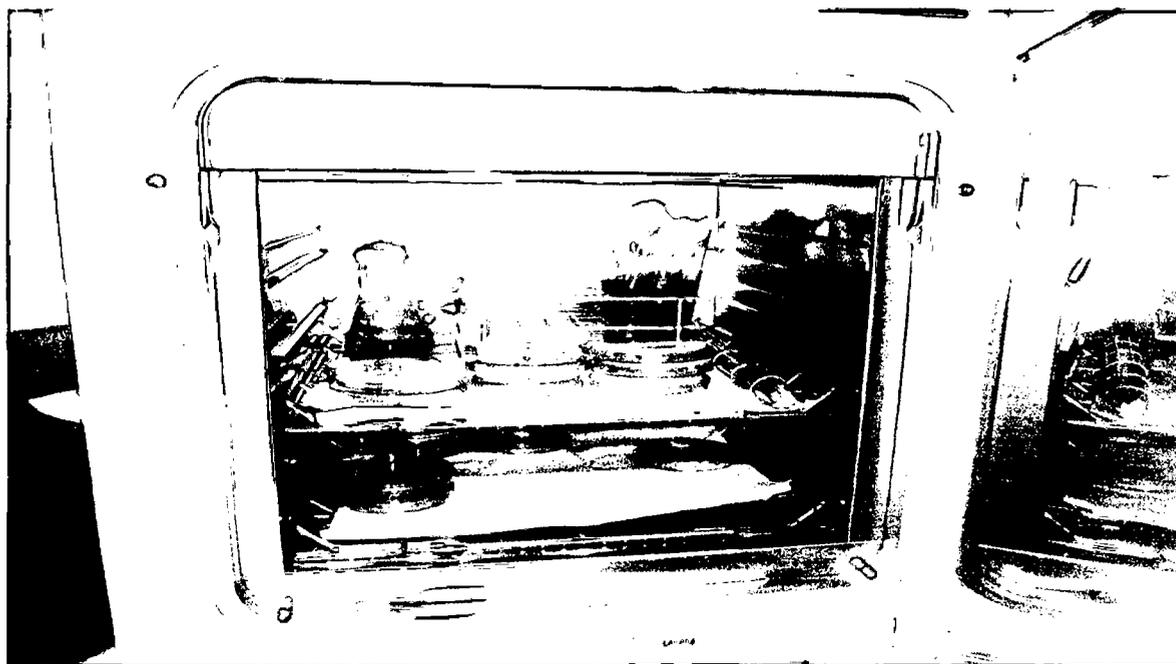
**FOTO N° 07: Utilizando el equipo compacto de digestión MBC/02 .**



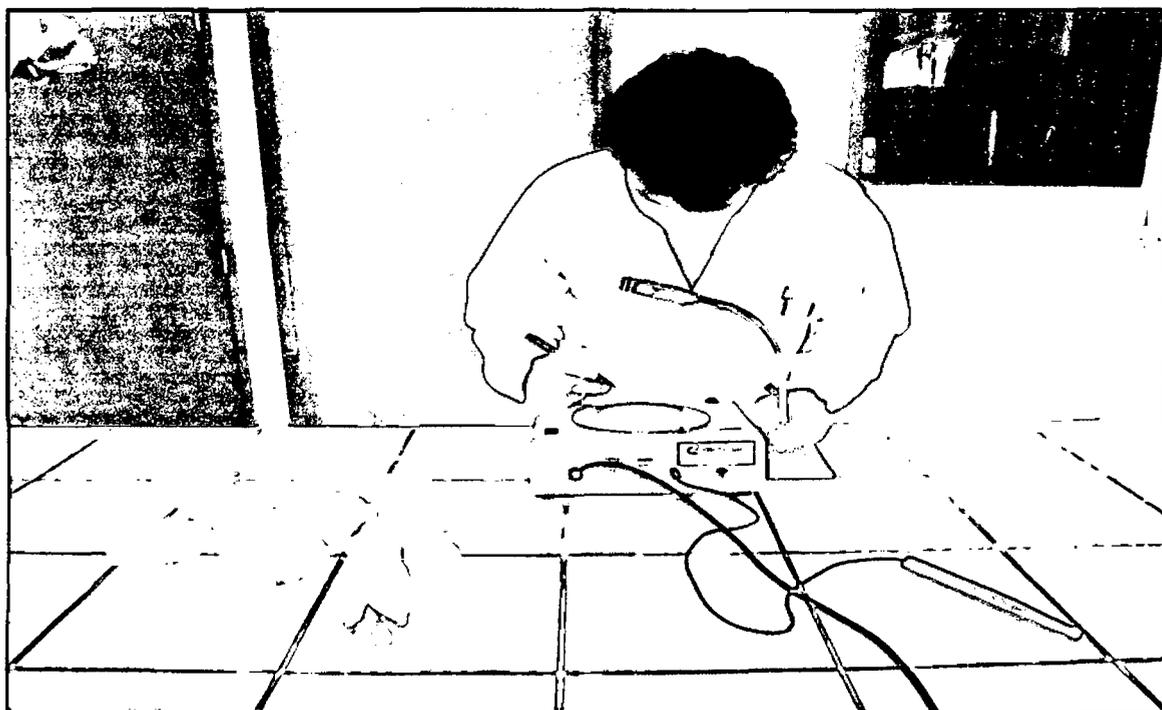
**FOTO N° 08: Preparando la muestra de kefir para determinar el porcentaje de grasa**



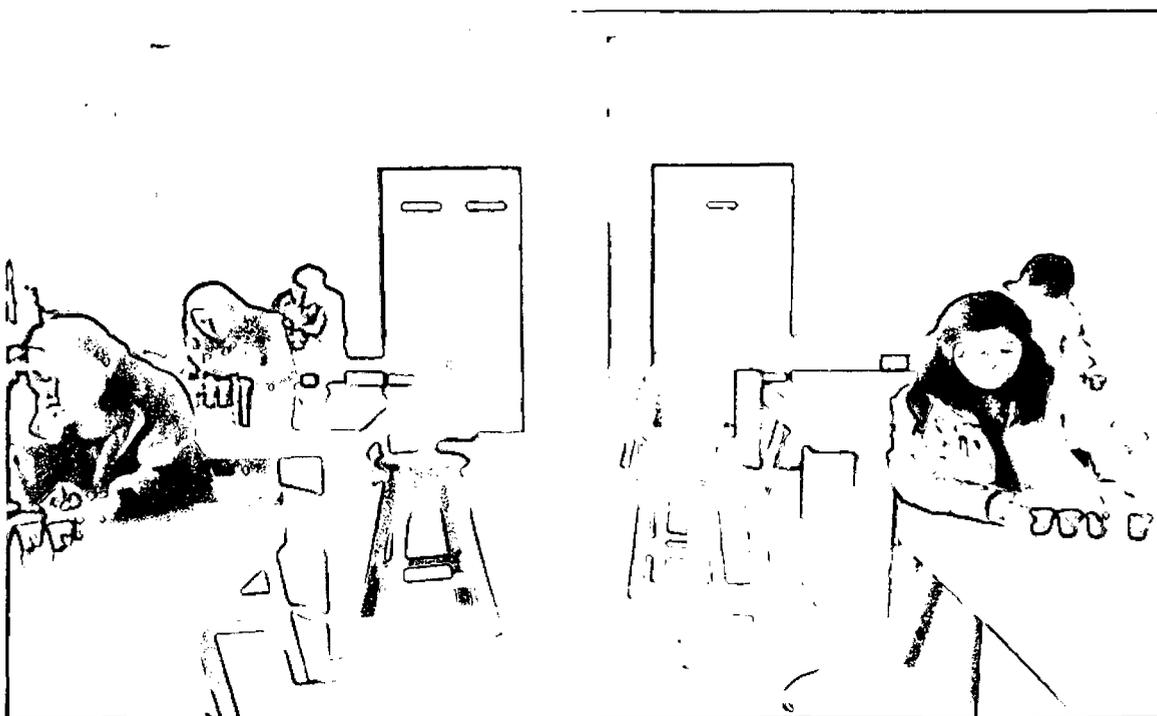
**FOTO N° 09: Realizando las técnicas de recuento microbiológico.**



**FOTO N° 10: Muestras listas para la incubación por 24 h a una temperatura de 37 °C.**



**FOTO N° 11: Realizando la lectura de las placas, con el contador de colonias.**



**FOTO N° 12: Panelistas realizando el análisis sensorial de aceptación del producto**

## **IX. APÉNDICES**

**APÉNDICE N° 01**

**TEST DE ANALISIS SENSORIAL – PRUEBA DE NIVEL DE ACEPTACIÓN  
ESCALA HEDÓNICA**

FECHA: .....

HORA:.....

**PRODUCTO: Bebida fermentada tipo kefir**

Pruebe Ud. las muestras que se le está presentando, e indique su nivel de aceptación en cuanto a los atributos presentados de acuerdo a la siguiente escala:

<b>Puntaje</b>	<b>Nivel de agrado</b>
5	Me gusta mucho
4	Me gusta moderadamente
3	No me gusta ni me disgusta
2	Me disgusta moderadamente
1	Me disgusta mucho

MUESTRA	AROMA	SABOR	COLOR	CONSISTENCIA
13				
62				
31				
120				

OBSERVACIONES:.....  
.....  
.....

**GRACIAS POR SU PARTICIPACION**

## APÉNDICE N° 02

### **NORMAS TECNICAS NACIONALES PARA LECHE FRESCA**

**INDECOPI (Instituto Nacional de defensa de la competencia y de la protección de la propiedad intelectual) (2003): Normas Técnicas Nacionales: Leche cruda: requisitos; NTP 202.001.**

A continuación, se presentan las propiedades fisicoquímicas de la leche según la NTP: 202.001:2003, las cuales sirven para controlar que la leche no haya sufrido alteraciones ni adulteraciones.

- Grasa: 3.2%
- Sólidos totales: 11.4%
- Acidez: 0.14 –0.18%
- Prueba del alcohol Mín 74°: No coagulable.
- Reductasa azul de metileno: Mín. 4 h
- Sustancias conservadoras y cualquier otra sustancia extraña a su naturaleza: Ausencia.
- Numeración de **microorganismos** mesófilos aerobios y facultativos viables: Máx. 1 000 000 ufc/ml
- Numeración de **coliformes**: Máx. 1 000 ufc/ml
- Conteo de células somáticas: Máx. 500 000 cel/ml

### APÉNDICE N° 03

#### **NORMAS TECNICAS INTERNACIONALES PARA LECHE FERMENTADAS.**

##### **1. Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Leches Fermentadas.**

###### **MERCOSUR/GMC/RES n° 47/97**

Requisitos para leches fermentadas o cultivadas:

a. Por el contenido de grasa:

Con crema: min. 6g/100g,

Entera o integral mín. 3g/100g,

Parcialmente descremada máx. 2,9g/100g y

Descremada máx. 0,5g/100g.

b. Contenido de Acidez: de 0,6 a 2,0 g/100g (60° Domic a 200° Domic).

c. proteínas lácteas min. 2,9

d. Recuento de microorganismos benéficos: mín.  $10^6$  ufc/g

e. Recuentos de contaminantes microbianos:

coliformes/g (n=5, c=2, m=10, M=100);

hongos y levaduras/g (n=5, c=2, m=50, M=200).

f. Condiciones de conservación y comercialización: las leches fermentadas deberán conservarse y comercializarse a una temperatura no superior a 10° C.

Teniendo en cuenta las propiedades de los productos en particular se tiene:

**TABLA N° 37: Propiedades fisicoquímicas de acuerdo a los productos en particular**

PRODUCTO	Propiedad fisicoquímica	
	Acidez gr de ácido láctico/100gr	Etanol (% v/m)
yogurt	0,6 a 1,5	-
Leche fermentada o cultivada	0,6 a 2,0	-
Leche acidofila o acidofilada	0,6 a 2,0	-
Kefir	<1,0	0,5 a 1,5
Kunys	>0,7	Min. 0,5
Cajada o Coalhada	0,6 a 2,0	-

**TABLA N° 38: Cantidad de microorganismo presente en las diferentes leches fermentadas**

PRODUCTO	Tipo de microorganismo	
	Recuento de bacterias lácticas totales (UFC/gr)	Recuento de levaduras específicas (UFC/gr)
yogurt	Min. $10^7$ *	-
Leche fermentada o cultivada	Min. $10^6$ *	-
Leche acidofila o acidofilada	Min. $10^7$	-
Kefir	Min. $10^7$	Min. $10^4$
Kunys	Min. $10^7$	Min. $10^4$
Cajada o Coalhada	Min. $10^6$	-

\*en el caso que se mencione el uso de bifidobacterias el recuento será de un mínimo  $10^6$  UFC de bifidobacterias/gr.

## 2. NORMA DEL CODEX PARA LECHE FERMENTADAS

### *CODEX STAN 243-2003*

#### **Descripción para la leche fermentada**

La **Leche Fermentada** es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición según las limitaciones de lo dispuesto en la Sección 3.3 (del documento original), por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables.

Ciertas Leches Fermentadas se caracterizan por un cultivo específico (o cultivos específicos) utilizado para la fermentación del siguiente modo:

**Yogur:** Cultivos simbióticos de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*.

#### **Yogur en Base a**

**Cultivos Alternativos:** Cultivos de *Streptococcus thermophilus* y toda especie *Lactobacillus*.

**Leche Acidófila:** *Lactobacillus acidophilus*.

**Kefir:** Cultivo preparado a partir de gránulos de kefir, *Lactobacillus kefiri*, especies del género *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter* que crecen en una estrecha relación específica.

Los gránulos de kefir constituyen tanto levaduras fermentadoras de lactosa (*Khyveromyces marxianus*) como levaduras fermentadoras sin lactosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*).

**Kumys:** *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Khyveromyces marxianus*.

Podrán agregarse otros microorganismos aparte de los que constituyen el cultivo específico (o los cultivos específicos) especificados anteriormente.

**TABLA N° 39:** Composición fisicoquímica de los diferentes productos

Componente	Producto			
	Leche fermentada	Yogur, yogur en base a cultivos alternativo y leche acidófila	Kefir	Kumys
Proteína láctea*(% w/w)	Min 2,7%	Min 2,7%	Min 2,7%	-
Grasa láctea (%w/w)	Menos del 10 %	Menos 15%	Menos del 10 %	Menos del 10 %
Acidez valorable, expresada como % de ácido láctico (%w/w)	Min 0,3 %	Min 0,6%	Min 0,6 %	Min 0,7 %
Etanol (%vol/w)	-	-	-	Min 0,5 %

**TABLA N° 40:** Composición microbiológica de los diferentes productos

Componente	Producto			
	Leche fermentada	Yogur, yogur en base a cultivos alternativo y leche acidófila	Kefir	Kumys
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido (ufc/g en total)	Min. $10^7$	Min. $10^7$	Min. $10^7$	Min. $10^7$
Microorganismos etiquetados** (ufc/gr en total)	Min. $10^6$	Min. $10^6$		
Levaduras (ufc/g)			Min. $10^4$	Min. $10^4$

\* El contenido en proteínas es 6,38 multiplicado por el nitrógeno Kjeldahl determinado.

\*\* Se aplica cuando en el etiquetado se realiza una declaración de contenido que se refiere a la presencia de un microorganismo específico que ha sido agregado como complemento del cultivo específico.