



FORMULACIÓN Y ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE BEBIDA REALIZADA A BASE DE KÉFIR DE AGUA

LAURA SOLEDAD CIA

Tesis presentada para acceder al grado académico de
Licenciatura en Bromatología.

Sede Lujan de Cuyo: **Facultad de Ciencias Agrarias - UN
Cuyo**

San Rafael, Mendoza 2024

**FORMULACIÓN Y ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE BEBIDAS REALIZADAS A BASE
DE KÉFIR DE AGUA**

Autora: Brom. Laura Soledad Cia – laucia82@gmail.com

Directora: Lic. Brom. Stella Lourdes ALCANTÚ

Co directora: Dra. Ing. Qca. Emilia RAIMONDO

Asesora de Estadística: Lic. en Bromatología María Eugenia MARTINEZ

Esta Comisión, de conformidad a lo establecido en la Ordenanza 626, sugiere la formación del siguiente Tribunal Evaluador:

Presidente: Dra Lic. Brom. María SANCE

Vocales: MSc. Lic. Brom. María Laura SANCHEZ

Dra. Lic. Brom. Cecilia FUSARI

Suplente: Bqca. Brom. Silvina FARRANDO

Resumen

El presente estudio se centró en la formulación y análisis de una bebida artesanal fermentada con gránulos de kéfir en agua, con el objetivo de investigar cómo diferentes tipos de endulzantes influyen en las características químicas, microbiológicas y nutricionales de la bebida. Durante la investigación, se elaboraron tres variantes de bebidas de agua de kéfir utilizando distintos endulzantes: miel, azúcar mascabo y azúcar blanca. En cuanto a las propiedades químicas, se encontraron diferencias en la concentración de azúcares finales, siendo la bebida elaborada con mascabo la que mostró mayor consumo de azúcares a lo largo del tiempo, por consiguiente, se vio reflejado en los resultados físico-químicos. En relación a las características microbiológicas, se observaron variaciones en la presencia de bacterias ácido lácticas y levaduras según el endulzante utilizado. En cuanto al perfil nutricional, en las tres bebidas se observó disminución en el valor de azúcares añadidos y cabe destacar que la bebida con mascabo presentó trazas de minerales y vitaminas propias del jugo de caña, lo cual favoreció la multiplicación de levaduras y bacterias.

Palabras clave: bebida de kéfir, endulzantes, propiedades químicas, características microbiológicas, perfil nutricional.

SUMMARY

The present study focuses on the formulation and analysis of an artisanal drink fermented with kefir granules in water, with the objective of investigating how different types of sweeteners influence the chemical, microbiological and nutritional characteristics of the drink. During the research, three variants of kefir water drinks were made using different sweeteners: honey, mascabo sugar and conventional sugar. Regarding the chemical properties, differences were found in the concentration of final sugars, with the drink made with mascabo being the one that showed the highest sugar consumption over time; therefore, it was reflected in the results in relation to physical-chemical. Microbiological characteristics, variations will be observed in the presence of lactic acid bacteria and yeasts depending on the sweetener used. Regarding the nutritional profile, in the three drinks the decrease in the value of added sugars increases and it is worth noting that the drink with mascabo presents traces of minerals and vitamins typical of cane juice, which favors the multiplication of yeasts and bacteria

Keywords: kefir drink, sweeteners, chemical properties, microbiological characteristics, nutritional profile.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más Sincero agradecimiento a todas las personas que han sido fundamental en la realización de esta tesis:

A la **Lic. Brom. Stella Lourdes ALCANTÚ**, a la **Dra. Ing. Qca. Emilia RAIMONDO** y a la **Lic. Brom. María Eugenia MARTINEZ**, por su dedicación, orientación y por creer en este proyecto desde el inicio hasta la culminación.

A **mi Hijo Joaquín, mis padres y mi Hermana** cuya presencia y apoyo incondicional han sido mi motivación para llevar a cabo dicha tesis.

Y finalmente **a Dios y a la Virgen** por guiarme y darme las fortalezas necesarias para enfrentar cada desafío.

INDICE GENERAL

Presentación.....	I
Resumen.....	II
SUMMARY.....	III
CAPÍTULO I: MARCO CONCEPTUAL.....	8
1.1. INTRODUCCIÓN	8
1.2. Alimentos Funcionales	9
1.3. Kéfir de Agua	10
1.4. Historia de los Probióticos	12
1.5. Efectos benéficos de los probióticos.....	13
1.6. Procedimiento de la elaboración de Kéfir de Agua	14
1.7. Proceso de Extracción, características fisicoquímicas e información nutricional de los endulzantes:	15
1.8. Metabolismo Microbiano en la Elaboración de Agua de Kéfir	18
CAPÍTULO II: MARCO EXPERIMENTAL.....	22
2.1. Objetivo generales y particulares:	22
2.2. Hipótesis del trabajo.....	22
2.3. Materiales y métodos	22
2.4. Proceso de Elaboración de la bebida de Kéfir de agua	24
2.5. Diagrama del proceso de elaboración.....	25
2.6. Análisis Físico-químicos.....	27
2.7. Determinación de Sólidos solubles (°Brix).....	27
2.8. Determinación de pH	27

2.9. Determinación de acidez titulable.....	27
2.10. Análisis Microbiológicos.....	28
2.11. Análisis físico químicos. Determinación de la composición centesimal...29	
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
3.1. Análisis Físicoquímicos.....	30
3.2. Análisis Microbiológico.....	35
3.3. Composición Nutricional de las bebidas fermentadas	39
CAPÍTULO IV: CONCLUSIÓN	47
Anexo N° I.....	48
Anexo N° II.....	52
Anexo III.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulación de las bebidas elaboradas	23
Tabla 2. Recuento de Levadura	35
Tabla 3. Recuento de bacterias ácido lácticas.....	36
Tabla 4 Análisis nutricional de la bebida con el agregado de azúcar blanca.....	40
Tabla 5 Análisis Nutricional de la bebida con el agregado de miel.....	40
Tabla 6 Análisis Nutricional de la bebida con el agregado de mascabo	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Cambio de Sólidos Solubles (Brix) a lo largo del tiempo	31
Figura N° 2 Cambio de pH a lo largo del tiempo	33
Figura N° 3 Cambio de acidez a lo largo del tiempo.....	34
Figura 4 Fotografías del campo microscópico de la bebida elaborada con endulzante miel	38
Figura 5 Fotografía del campo microscópico de la bebida endulzada con azúcar blanca	38
Figura 6 Fotografía del campo microscópico de la bebida endulzada con mascabo ..	39
Figura 7 Variación de carbohidratos en g/100 ml vs horas.....	42

CAPÍTULO I: MARCO CONCEPTUAL

1.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado el interés por bebidas realizadas a base de Kéfir debido que justifican, que su consumo brinda potenciales efectos benéficos para la salud, como por ejemplo la prevención de enfermedades intestinales y fortalecimiento del sistema inmunológico (García Torres, J., Hernandez de Bermudez, R., 2015). Es por esto que se considera relevante elaborar esta bebida, a partir de materia primas conocidas empleando microorganismos que produzcan fermentación láctica y alcohólica. Y una vez obtenida dilucidar las características fisicoquímicas, microbiológicas y nutricionales del producto.

En Argentina para poder considerar un alimento apto o no para el consumo, se deben registrar bajo el Código Alimentario Argentino en el cual se establecen los requisitos que deben tener los alimentos para ser aptos para el consumidor final. En la reunión de la CONAL, que se llevó a cabo el 8 de junio del 2022, evaluaron la inclusión del kéfir de agua al Código Alimentario Argentino y el 14 de agosto del 2024 finalmente lo incorporaron en el capítulo XIII: "Bebidas Fermentadas" en el artículo 1084 tris. En el Anexo I, se especifica dicho artículo.

Las bebidas fermentadas son líquidos cuyo proceso involucra el crecimiento de microorganismos (García, 2004). Por lo general son elaboradas de forma casera, muchas veces estas no cuentan con la asepsia necesaria, motivo por el cual pueden estar contaminadas, o en su caso se dicen que contienen propiedades que benefician la salud, y no lo tienen, por tal razón las personas estarían poniendo muchas veces en riesgo su salud. Por ende, no es regla general que su consumo sea beneficioso para la salud, por lo que antes de iniciar a tomarlas se debería hacer los análisis correspondientes. Por ello sería importante industrializarlas, siguiendo Buenas

Prácticas de Manufactura, asegurando las propiedades benéficas, así como la inocuidad de estas bebidas

1.2. Alimentos Funcionales

Los alimentos funcionales son beneficiosos para la salud, trascienden a las características nutricionales e involucran efectos fisiológicos. Estos incluyen: los probióticos, prebióticos y simbióticos, los cuales generan el balance en el microbiota intestinal. Se ha incrementado en el mercado la demanda de alimentos que permiten al consumidor implementar hábitos alimenticios más saludables esto acompañado con el incremento de la intolerancia a la lactosa, lo que ha incentivado a investigar, estudiar y desarrollar una generación de productos de origen vegetal, principalmente bebidas de fruta, con adición de microorganismos probióticos. (M.F. Juárez-Chairez, Y. T. Gallardo-Navarro, 2018)

El término alimento funcional (AF) surgió en Japón en la década de los 80's y a partir de entonces ha sido aceptado internacionalmente, no existe una definición universal; una de las más utilizadas es: "Un alimento funcional es un alimento convencional, que forma parte de una dieta estándar en cantidades normales, además de aportar un valor nutritivo, ha demostrado tener un beneficio en la salud mediante un efecto fisiológico en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas". En la actualidad, la gama de alimentos funcionales incluye: alimentos para bebés, productos horneados y cereales, productos lácteos, confitería, comidas preparadas, aperitivos, productos cárnicos, pastas para untar y bebidas. Las bebidas tienen desafíos tecnológicos, entre ellos la viabilidad y el efecto sensorial. (Bernal Castro et al., 2017)

1.3. Kéfir de Agua

El kéfir de agua es una bebida fermentada que contiene bacterias como *lactobacilos* y levaduras, también conocido como “aquakefir” o “sugary kéfir” con gas, ligeramente ácida que se produce fermentando una solución de sacarosa, a la que se le han añadido frutos deshidratados, con granos de kéfir de agua llamado tíbicos. (Laureys *et al.*, 2019; Ferrari *et al.*, 2020)

El origen de los gránulos de kéfir de agua es aún incierto. Existen algunas descripciones de gránulos similares llamados “plantas de cerveza de jengibre” que soldados ingleses importaron de la guerra de Crimea en 1855 (Florian W. Waldherr, Viktoria M. Doll, Daniel Meißner, Rudi F. Vogel, 2010) Son varios los nombres con los que se les conoce a los tíbicos, como: “abejas de California”, “abejas africanas”, “nueces de cerveza”, “balm of gilead” y “semillas japonesas de cerveza”. Finalmente fueron denominados “granos de kéfir azucarado” con el fin de distinguirlos del kéfir de leche (waldherr *et al.*, 2010)

Los tíbicos son gránulos similares a una coliflor, con un diámetro promedio de 5 a 20 mm, apariencia transparente y estructura elástica (waldherr *et al.*, 2010). Estos granos gelatinosos son un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras incrustadas en una matriz de polisacáridos. La microbiota de los tíbicos está compuesta por exopolisacáridos insoluble en agua que son polímeros de carbohidratos exocelulares (glucosa con enlaces α 1-6) presentes en la superficie de muchas bacterias, incluyendo bacterias del ácido láctico (BAL) y bifidobacterias.

El crecimiento de bacterias produce una acidificación del medio, permitiendo el crecimiento de levaduras. A su vez, la producción de factores de crecimiento (vitaminas) y compuestos nitrogenados solubles, proveniente de las levaduras, permite el desarrollo de las bacterias complementándose así ambos microorganismos (Magalhaes KT, de M. Pereira GV, Días DR, Schwan RF, 2010)

Dentro de los microorganismos presentes en el kéfir de agua, las principales bacterias en orden decreciente son *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus harbinensis*, *Lactobacillus nagelii*, *Acetobacter lovaniensis/fabarum*, y *Lactobacillus hordei/mali* (Laureys D, De Vuyst L, 2014). Con respecto a las levaduras, la más predominante es la *Saccharomyces cerevisiae* (Laureys D, De Vuyst, 2017)

La bacteria *Lactobacillus hilgardii* ha sido identificada como la principal productora del exopolisacárido (Leroi, Pidoux M, 1993). Las bacterias ácido lácticas (LAB) producen ácido láctico a partir de hexosas, en su mayoría son aerotolerantes y crecen dentro de un rango de pH de 4 a 4,5 (Pidoux M, 1989). Dentro de las levaduras encontramos, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Lachancea*, las cuales son dominantes en las primeras etapas de fermentación y luego, la *Saccharomyces cerevisiae*, es la más predominante (Morrissev WF, Davenport B, Querol A, Dobson ADW, 2004). La sacarosa estimula su crecimiento, a partir de este sustrato la *S. Cerevisiae* da como resultado glucosa y fructosa (Ikram-ul-hag, Ali S, 2020)

Sin embargo, diferentes autores sugieren que las especies que predominan dentro de la microbiota de los granos de kéfir depende del origen geográfico de estos, del sustrato y de las condiciones de fermentación. Estos factores afectan en última instancia a las características de la bebida producida en términos de aroma, sabor y acidez. (Horisberger M, 1969) (Rubio MT, Lappe P, Wachter C, Ulloa M, 1993)

La elaboración de kéfir de agua se ha producido tradicionalmente a pequeña escala y el uso de cultivos iniciadores definidos no se practica comúnmente. Sin embargo, a medida que el kéfir de agua se hace más popular, aumenta la necesidad de una comprensión profunda de la biología y la dinámica del mismo, para lograr una producción industrial en la cual se requieren procesos de elaboración definidos y controlados, para lograr una bebida cuyas características sean homogéneas e inocuas en todos los lotes (Lynch KM, WiKinson S, Daenen L, 2021)

Nace también como una alternativa para aquellas personas que no consumen leche, como veganos, intolerantes a la lactosa o alérgicos a proteínas lácteas

1.4. Historia de los Probióticos

El término probiótico significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. De hecho, el nombre kéfir deriva de la palabra eslava “*keif*” que significa “bienestar” o “vivir bien”. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles" (Metchnikoff, 1907)

Las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias, aun cuando la palabra "probiótico" no se acuñó hasta 1960, para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos, con objeto de recalcar el carácter microbiano de los probióticos, definió de nuevo el término como "un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal". (1992) propusieron una definición muy similar: "un monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona". Una definición más reciente, es la siguiente: "microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables " (Guarner, Schaafsma, 1998)

En Argentina en diciembre de 2011, se ha reglamentado el uso de probióticos como componente de los alimentos en el Código Alimentario Argentino art.1389(Anexo II) (Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011, 2011). Esta reglamentación se propuso a razón de las tendencias mundiales y del aumento del número y tipo de alimentos y bebidas con agregado de probióticos disponibles para los consumidores

1.5. Efectos benéficos de los probióticos

Los probióticos son bacterias ácido lácticas, que al ser ingeridas son capaces de soportar la digestión y llegar al intestino para colonizarlo, poseen numerosas características metabólicas, como su acción acidificante, proteolítica, síntesis de bacteriocinas, resistencia al ataque de virus y la producción de exopolisacárido. Todas estas actividades contribuyen con el sabor, textura y frecuentemente con los atributos nutricionales de los productos. La actividad de inhibición de otras bacterias puede ser el resultado de la producción de diferentes ácidos y metabolitos como ácido láctico y ácidos orgánicos similares, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, así como diacetilo y CO₂ (Adams y Moss, 1997)

Levaduras: *Saccharomyces*. - Son levaduras ascosporógenas que se multiplican por geminación multilateral y producen esporas redondas dentro de ascas. Son diploides y no fermentan lactosa (Jay, 1994). La calidad organoléptica presente en el kéfir se debe a la presencia de *S. cerevisiae*. Este género permite que la bebida tenga un fuerte y típico aroma a levadura, así como un sabor refrescante y pungente. Además, reduce la concentración de ácido láctico, remueve el peróxido de hidrógeno, produce compuestos que estimulan el crecimiento de otras bacterias benéficas, y estimula la producción de exopolisacáridos (Texeira et al, 2010)

La simbiosis entre levaduras y bacterias en los “típicos” se lleva a cabo debido a que el crecimiento de las levaduras se produce por la acidificación del medio creado por las bacterias;

mientras que el crecimiento de las bacterias es estimulado por la producción de factores de crecimiento (vitaminas) y compuestos nitrogenados solubles por parte de las levaduras (Texeira et al, 2010)

1.6. Procedimiento de la elaboración de Kéfir de Agua

Para la realización de kéfir de agua se inocula agua segura con gránulos (1,53% m/v), con la adición de endulzante (4,3% m/v), fruta deshidratada pasas de uva (1 g en un litro) y limón en rodajas (100 g en un litro). Estos últimos, son utilizados para acidificar el medio y saborizar. Esto debe ser lentamente agitado para homogenizar la mezcla. La fermentación se realiza a una temperatura entre 25 y 30°C, en un recipiente de vidrio tapado con tela de gasa para permitir el paso de oxígeno. Esto es necesario sobre todo en las primeras horas de fermentación para la proliferación de las bacterias ácido lácticas (Laureys D, Aerts M, Vandame P, De vuyst L, 2018)

A continuación, una breve descripción del proceso de extracción e información nutricional de cada endulzante elegido en la investigación

1.7. Proceso de Extracción, características fisicoquímicas e información nutricional de los endulzantes:

1.7.1. Azúcar Blanca

El proceso de extracción de la azúcar blanca implica varios pasos de refinación. Primero, la caña de azúcar o remolacha azucarera es cosechada y triturada para extraer el jugo. Este jugo se trata con cal y otros agentes clarificantes para eliminar impurezas, luego se evapora para concentrar el contenido de azúcar. El jarabe concentrado se cristaliza mediante enfriamiento controlado, y los cristales de azúcar se separan del jarabe restante (melaza) mediante centrifugación. Finalmente, los cristales de azúcar se lavan, disuelven y vuelven a cristalizar varias veces para obtener el azúcar blanco puro (van der Poel, Shiweck & Shwart, 1998)

Características Fisicoquímicas

Composición química: Principalmente sacarosa (99.9%).

Color: Blanco debido al proceso de refinación que elimina las melazas.

Granulometría: Cristales uniformes.

Solubilidad: solubilidad en agua.

pH: Neutro a ligeramente ácido (entre 6.5 y 7).

Características Nutricionales

Calorías: Aproximadamente 387 calorías por 100 gramos.

Carbohidratos: 99.98 gramos por 100 gramos, principalmente en forma de sacarosa.

Vitaminas y Minerales: Prácticamente no contiene vitaminas ni minerales significativos debido a su alto grado de refinamiento.

CAA Artículo N°761: Define y regula el azúcar refinado o blanco.

CAA Artículo 762: Especifica los requisitos de calidad y pureza del azúcar refinado.

1.7.2. Azúcar Mascabo

El azúcar mascabo se produce mediante un proceso menos refinado que conserva más componentes naturales, como la melaza. La caña de azúcar es cosechada y triturada para extraer el jugo, el cual se filtra para eliminar sólidos y algunas impurezas, pero sin el uso extensivo de productos químicos. Luego, el jugo clarificado se evapora parcialmente para concentrar el azúcar, y el jarabe concentrado se cocina hasta obtener una masa de cristales y melaza. Finalmente, la masa se seca y el azúcar mascabo se empaqueta sin más refinación (Rodríguez, 2010)

Características Fisicoquímicas

Composición química: Contiene sacarosa (85-90%), glucosa y fructosa.

Color: Marrón debido a la presencia de melaza.

Granulometría: Cristales irregulares y pegajosos.

Solubilidad: es moderadamente soluble en agua, y con residuos de melaza.

pH: Neutro a ligeramente ácido (entre 5.5 y 6.5).

Características Nutricionales

Calorías: Aproximadamente 380 calorías por 100 gramos.

Carbohidratos: 98 gramos por 100 gramos, con una mezcla de sacarosa, glucosa y fructosa.

Vitaminas y Minerales: Contiene pequeñas cantidades de minerales como calcio, hierro, magnesio y potasio, así como algunas vitaminas del complejo B.

CAA. Artículo 763: Define y regula el azúcar moreno o mascabo, especificando sus características de composición y pureza.

1.7.3. Miel

La miel se extrae principalmente a través de la recolección, desoperculado, centrifugado y filtrado, sin necesidad de procesos de refinamiento adicionales. Las abejas recolectan néctar de las flores y lo convierten en miel dentro de los panales. Los apicultores retiran la capa de cera que sella las celdas del panal (desoperculado) y luego colocan los panales en una centrifugadora para extraer la miel. Finalmente, la miel se filtra para eliminar partículas de cera y otros residuos, y se envasa directamente (Crane, 1990)

Características Fisicoquímicas

Composición química: Principalmente glucosa (30-40%) y fructosa (30-40%), agua (aproximadamente 17-20%), con pequeñas cantidades de sacarosa y otros azúcares.

Color: Varía desde casi incoloro hasta ámbar oscuro, dependiendo de la fuente floral.

Viscosidad: la viscosidad de la miel se encuentra típicamente entre los valores de 10 a 2000 centipoises (cP), ya que depende de varios factores como la temperatura, la fuente floral y la humedad. La miel tiene una actividad acuosa generalmente en el rango de 0.5 a 0.6, lo que significa que tiene una concentración alta de azúcares y otros solutos que hacen que el agua esté

fuertemente ligada y no esté disponible para la mayoría de los microorganismos, lo que contribuye a su larga vida útil y propiedades antimicrobianas.

pH: Ligeramente ácido (entre 3.2 y 4.5).

Características Nutricionales

Calorías: Aproximadamente 304 calorías por 100 gramos.

Carbohidratos: 82.4 gramos por 100 gramos, principalmente en forma de glucosa y fructosa.

Vitaminas y Minerales: Contiene pequeñas cantidades de vitaminas (B6, tiamina, niacina, riboflavina, ácido pantoténico) y minerales (calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, zinc).

CAA. Artículo 783: Define y regula la miel, estableciendo los estándares de calidad y las características que debe cumplir.

De los tres endulzantes, el azúcar mascabo contiene la mayor cantidad de minerales, seguido por la miel, mientras que la azúcar blanca tiene el menor contenido mineral debido a su alto grado de refinamiento (Penninton 2002, National Honey Board, 2012).

1.8. Metabolismo Microbiano en la Elaboración de Agua de Kéfir

La fermentación del agua de kéfir involucra una compleja interacción entre bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras presentes en los gránulos de kéfir. Cada grupo microbiano contribuye de manera específica al proceso de fermentación, resultando en una bebida con

características particulares. A continuación, se describe el metabolismo de cada grupo microbiano y los productos que se pueden esperar en la bebida de agua de kéfir.

1.8.1. Metabolismo: Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)

Las BAL fermentan los azúcares presentes (principalmente glucosa y fructosa) a través de dos vías principales: homoláctica y heteroláctica.

Vía homoláctica: La glucosa se metaboliza en dos moléculas de ácido láctico.

Vía heteroláctica: La glucosa se metaboliza en ácido láctico, ácido acético y etanol.

Productos esperados (Axelsson L, 2004)

Ácido láctico: Aporta acidez a la bebida.

Ácido acético: Proporciona un sabor ligeramente ácido.

Etanol: Presente en pequeñas cantidades, contribuye al perfil de sabor.

CO₂: Genera efervescencia natural en la bebida.

1.8.2. Metabolismo Levaduras

Las levaduras fermentan los azúcares (principalmente glucosa y fructosa) a través de la fermentación alcohólica.

Fermentación alcohólica: La glucosa se metaboliza en etanol y dióxido de carbono (CO₂).

Productos esperados (Farnworth, 2005)

Etanol: Contribuye al sabor y preservación de las bebidas

CO₂: Responsable de la carbonatación natural.

Glicerol y ácidos orgánicos menores: Añaden complejidad al sabor.

1.8.3. Metabolismo General y Productos en el Agua de Kéfir

Durante la elaboración del agua de kéfir, los gránulos de kéfir (una comunidad simbiótica de bacterias ácido-lácticas y levaduras) se añaden a una solución de agua con azúcar y, opcionalmente, frutas deshidratadas. El azúcar es la principal fuente de energía para los microorganismos.

Fermentación Láctica:

Las BAL fermentan los azúcares a ácido láctico, lo que reduce el pH de la solución, creando un ambiente ácido que inhibe muchos patógenos y microorganismos no deseables en proceso fermentativo.

Se producen también ácido acético y CO₂.

Fermentación Alcohólica:

Las levaduras fermentan los azúcares a etanol y CO₂, contribuyendo a la efervescencia y al contenido alcohólico (generalmente menos del 1%).

Interacción Microbiana:

Las BAL y las levaduras trabajan en simbiosis: las BAL producen ácidos que pueden inhibir algunas bacterias indeseadas, mientras que las levaduras pueden metabolizar compuestos que las BAL no pueden, y viceversa.

Productos esperados en el agua de kéfir:

Ácido láctico y ácido acético: Proporcionan acidez.

Etanol: el contenido suele estar entre 0,2 y 1%.

CO₂: Genera efervescencia.

Péptidos y polisacáridos: Derivados de los gránulos de kéfir, los mismo están inmersos en una matriz polimérica llamada kefiram que contiene una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras. Durante el proceso de fermentación, estos microorganismos transforman los nutrientes presentes en el medio, como los azúcares, en una variedad de compuestos, entre ellos péptidos y polisacáridos.

Vitaminas del grupo B y compuestos bioactivos: Producidos por la actividad microbiana.
(Axelsson, 2004; Farnworth 2005)

CAPÍTULO II: MARCO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo la presente investigación, se formularon los siguientes objetivos:

2.1. Objetivo generales y particulares:

Objetivo general:

Formular, elaborar y analizar la composición de la bebida artesanal diseñada, fermentada con gránulos de Kéfir en agua, variando el tipo de edulzante (miel, azúcar mascabo y azúcar blanca)

Objetivos particulares

- Caracterizar las propiedades químicas a las bebidas antes mencionadas.
- Determinar presencia de bacterias ácido láctico, hongos y levaduras
- Analizar el comportamiento nutricional de las bebidas

2.2. Hipótesis del trabajo

Las características químicas, microbiológicas y nutricionales están influenciadas por los diferentes endulzantes.

2.3. Materiales y métodos

El desarrollo de la bebida fue elaborada en forma artesanal, en domicilio particular.

Los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de microbiología perteneciente a la Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo.

El seguimiento de las características químicas y los análisis nutricionales se llevaron a cabo en un laboratorio de tercero en el departamento de San Rafael, provincia de Mendoza durante el mes de diciembre de 2019.

Las materias primas con la cual se llevo a cabo la elaboración de las bebidas fueron las siguientes:

Tibis fueron adquiridos de elaboraciones previas realizadas por consumidores sin poder especificar procedencia

- Azúcar blanca común tipo
- Azúcar Mascabo
- Miel
- Limones
- Pasas de uvas

La formulación de cada una de las bebidas elaboradas tiene la siguiente composición

Tabla 1.
Formulación de las bebidas elaboradas

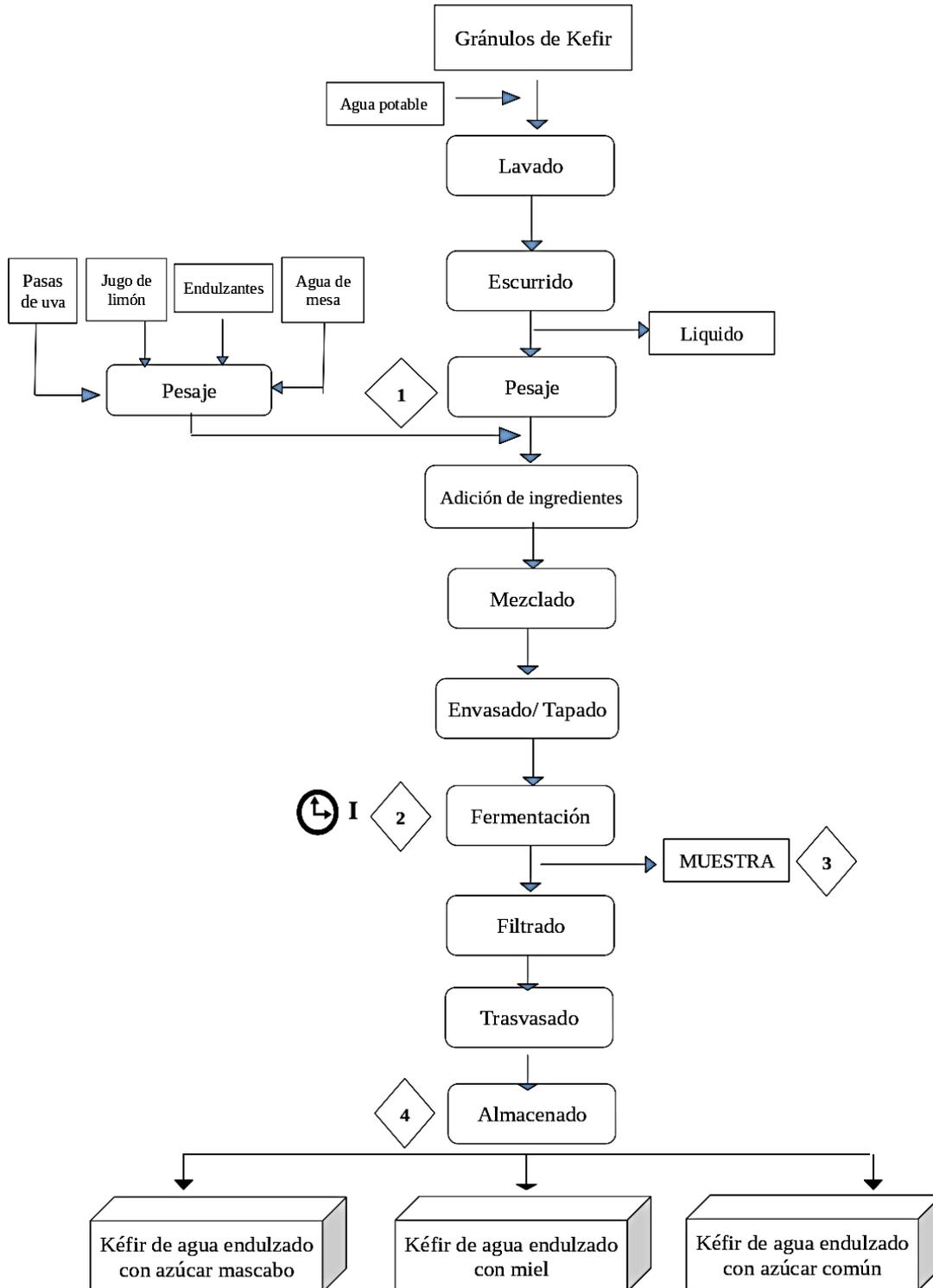
Ingredientes	Cantidad
Agua	1000 ml
Limón	100 g
Endulzante	50 g
Tínicos	18 g
Pasas de uvas	1 g

2.4. Proceso de Elaboración de la bebida de Kéfir de agua

- 1)- Preparación y pesaje de los granos de tibis, pasas de uva, endulzantes, y limón.
- 2)- En un frasco de vidrio limpio, de capacidad de un litro, primero agregar los granos de tibis, seguido por el endulzante, pasas de uva y limón.
- 3)- Se completa con agua de mesa hasta el litro, se deja libre el espacio de cabeza para la fermentación.
- 4)- Fermentación primaria: se cubre el frasco con una gasa ó una tapa de tela para permitir la entrada de aire y evitar acumulación de presión. El frasco se coloca en un lugar con poca luz a temperatura ambiente durante 72 h.
- 5)- Filtrado y separación de los tibis: pasado el tiempo de fermentación, se retiran los granos de tibis del líquido utilizando un colador plástico. Los granos se reservan en la heladera para utilizar en futuras bebidas.
- 6)-Refrigeración y almacenamiento: finalizadas las 72 h. se refrigera la bebida. El almacenamiento de la misma es de cinco días por la cantidad elaborada.

El seguimiento de la fermentación y la composición nutricional se realizó durante las 24, 48 y 72 h. luego de inoculada.

2.5. Diagrama del proceso de elaboración



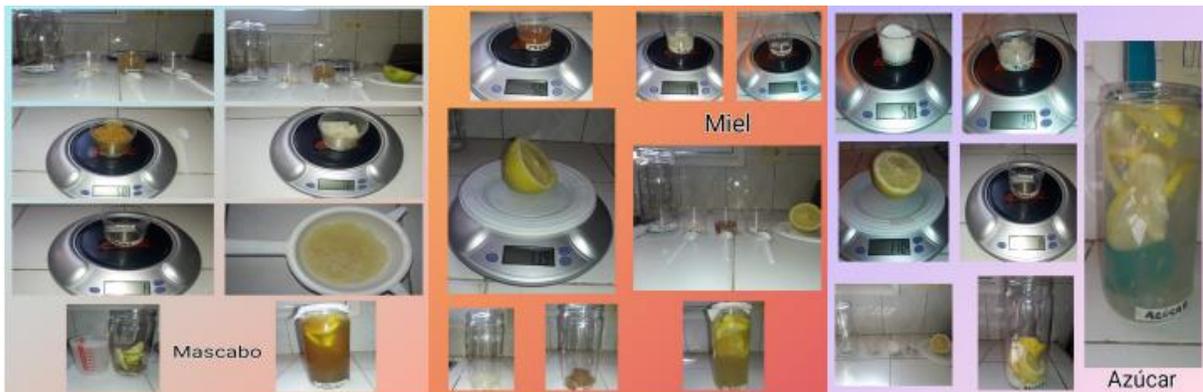
Controles:

- 1) Pesaje: Control de peso de los ingredientes
- 2) Fermentación: Control de tiempo y temperatura
- 3) Muestra: cada 24 horas se toma muestra y se realiza control de grados Brix, pH, acidez, recuento de bacterias lácticas, recuentos de hongos y levaduras y composición nutricional.
- 4) Almacenado: Control de temperatura de refrigeración

Control de reloj:

- 1) Fermentación: 72 h.

Descripción gráfica del proceso de elaboración artesanal



Se llevaron a cabo los siguientes análisis a la bebida kefir de agua

2.6. Análisis químicos

Se determinaron las características requeridas para la bebida, siendo: Acidez, Brix y pH. Las técnicas se realizaron según: C.A.A: Artículo 1414 – (Resolución Conjunta SPRyRS N° 13/05 y SAGPyA N° 85/05) “• A.O.A.C.: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (última Edición).

2.7. Determinación de Sólidos solubles (°Brix)

Se realizó usando un refractómetro ATAGO modelo SMART 1 y se basa en obtener el índice de refracción de soluciones que contengan principalmente sacarosa. Se tomó 1 ml por cada determinación.

2.8. Determinación de pH

Se realizó directamente del fermentado con un potenciómetro (Orión thermo, modelo: 420A+, Electrodo: Orion part code: HI 1332B, Cot. Nr: 15324).

2.9. Determinación de acidez titulable

Se tomaron 5 ml de kéfir en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se adicionaron 10 ml de agua destilada con 2 gotas de fenolftaleína. La titulación se realizó con NaOH 1 N hasta pH de 8,3 y se registró el volumen utilizado de NaOH por muestra. La acidez titulable se expresó como g de ácido láctico/100 ml utilizando la siguiente ecuación 1.

$$\%p/v \text{ ácido láctico} = \frac{\text{ml NaOH} \times N_{\text{NaOH}} \times \text{meq.ác} \times 100}{\text{Alícuota} \times 1000}$$

Dónde: ml NaOH es el gasto de NaOH; N NaOH es la normalidad del NaOH; meq.ácido es el peso en miliequivalente de ácido láctico (0,09 g/meq) y la alícuota utilizada fue de 5 ml.

2.10. Análisis Microbiológicos

Preparación de las Muestras:

Se pesaron 20 g de la muestra y se diluyó en 180 ml de citrato de sodio al 2%. Luego se preparó una serie de diluciones decimales adicionales, para lo cual se tomó 1 ml de la primera dilución y se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de solución de citrato de sodio al 2%, obteniendo de esta manera la dilución de 10^{-2} , éste procedimiento se repetirá hasta obtener a una dilución de 10^{-6} .

Recuento de Bacterias ácido lácticas (BAL)

Se sembró en superficie 0,1 ml de cada dilución en los medios MRS (Man. Rogosa y Sharpe) que es un agar selectivo para *Lactobacillus sp.* y medio M17 que promueve el crecimiento de cocos Gram positivos (*Pediococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*) y se incubó en una atmósfera micro-aerofílica (5% de CO_2) a 37 °C por 24,48 y 72 h

Recuento de levaduras

Se realizó una siembra con la técnica extensión en superficie 0,1 ml de cada dilución en el medio Saboraud con 4% de glucosa. La incubación se realizó en condiciones aeróbicas a 28°C de temperatura. El recuento de colonias se realizó a las 24,48 y 72h. de incubado.

2.11. Análisis físico químicos. Determinación de la composición centesimal

Para determinar la composición centesimal de la bebida se siguió el esquema Weende, que es el esquema autorizado por el Código Alimentario Argentino, en su Capítulo V.

Determinando:

- Humedad. Método de la A.O.A.C 950.46 B Método indirecto por desecación en estufa a 100-105°C, hasta peso constante.
- Grasa total. Método Directo por extracción con éter etílico (grasa bruta) (A.O.A.C. 960.39, 1990). Por extracción con éter etílico, mediante el método gravimétrico de Soxhlet.
- Fibras. Método ataque ácido alcalino
- Proteína bruta. (A.O.A.C. 928.08, 1990): Método de Kjeldahl, determinando Nitrógeno, utilizando 6,25 como factor de conversión en proteínas.
- Cenizas. Método Directo (A.O.A.C. 923.03, 1990) Por incineración en mufla (a 500±10 °C), hasta peso constante de las cenizas.

- Hidratos de carbono: Por diferencia

Sodio: Fotometría: sobre dilución de cenizas

Para el análisis de resultados químicos y microbiológicos se aplicó el análisis de la varianza (ADEVA), a través del software InfoStat

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El siguiente apartado destaca los logros alcanzados a través de un minucioso análisis de los datos recopilados durante el desarrollo de esta investigación.

3.1. Análisis Físicoquímicos

En el cuadro N° 1 se describen las medidas de las características físicoquímicas evaluadas durante la elaboración de agua de Kéfir con tres tipos de endulzantes (azúcar blanca, azúcar mascabo y miel)

Horas		24	48	72
Brix	Miel	6,108± 0,0075	6,052± 0,0021	5,96± 0,0894
	Azúcar Blanca	7,4 ± 0,2	6,19 ± 0,0089	5,92 ± 0,1049
	Azúcar Mascabo	6,298± 0,0078	4,998± 0,20155	3,312± 0,0194
pH	Miel	3,186± 0,012	3,02± 0,019	2,818± 0,024
	Azúcar Blanca	3,148± 0,0075	2,826± 0,0137	2,758± 0,0075
	Azúcar Mascabo	4,43± 0,02191	3,3 ± 0,0063	2,688± 0,0075
Acidez	Miel	0,604± 0,0049	0,696 ± 0,0206	0,81± 0,0126
	Azúcar Blanca	0,726± 0,0102	0,806± 0,0049	0,858 ± 0,0098
	Azúcar Mascabo	0,722 ± 0,0117	0,936 ± 0,0166	1,218 ± 0,0149

A continuación, se denotan cada una de las variables del Cuadro N° 1

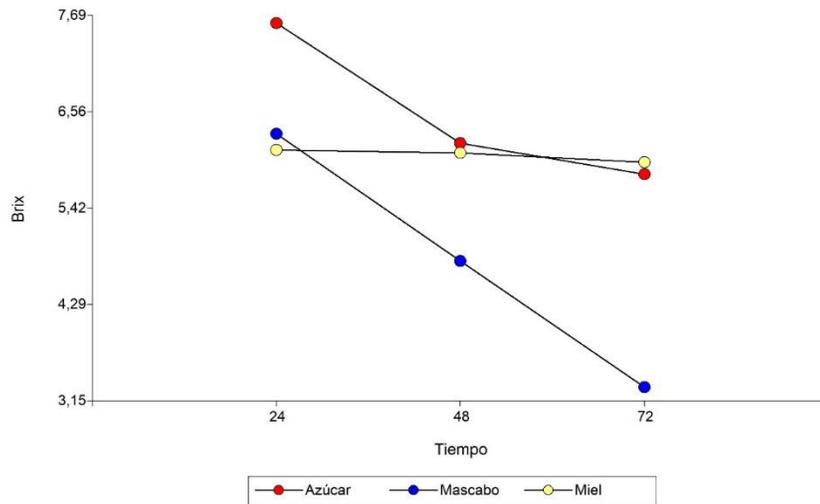


Figura N° 1

Cambio de Sólidos Solubles (Brix) a lo largo del tiempo(horas).

Según lo analizado en el cuadro N°1 los distintos endulzantes producen un efecto significativo sobre Brix promedio del kéfir (prueba de hipótesis secuencial, p-valor <0.0001), y son significativamente diferentes entre sí. Por lo tanto, a igual cantidad de endulzante se logran diferentes concentraciones de brix, siendo la miel la que menos genera. De esta manera el orden de °Brix de menor a mayor es Miel<Mascabo<Azúcar (5,05°Brix<5,24°Brix<6,54°Brix) por lo que las estimaciones dieron significativas para el modelo mixto (anexo III). La razón por la que disminuyen los grados Brix en el tiempo depende de las características y propiedades de cada tipo de endulzantes, (López, 2016) menciona que el % de solidos solubles en la formulación del kéfir de agua en algunos productos de fermentación con tísticos establece que dichos valores corresponden a 5,03 destacando que el sustrato influye directamente a este factor. Monroy *et al*, (2016) menciona que en la utilización de gránulos de kéfir en melaza establece una media de

6,68 ° Brix, lo que nos indica una mayor cantidad el azúcar para la producción de alcohol. Finalmente (Monar *et al* , 2014) indica la caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano donde establece en un lapso de 48 horas la media de grados brix es de 6,17% que evidencia la variabilidad con respecto al tiempo. Con respecto a los sólidos solubles los autores establecen que este factor depende del fruto utilizado ya que los microorganismos degradan los azucares y por efecto del pH estos incrementan las cargas que en la mayoría de casos son probióticas; cabe recalcar que en el estudio la azúcar mascabo demostró menores valores con respecto a los grados °Brix; por lo que se puede destacar que los gránulos del cultivo utilizado en la experiencia provenían de ser conservados en una solución que tenía azúcar de mascabo, es decir, ya tenían su metabolismo adaptado a este medio y de esa forma no se generó etapa de latencia en la curva de crecimiento de los microorganismos. El mascabo, es un tipo de azúcar integral que se obtiene al procesar el jugo de caña de azúcar sin refinar. A diferencia del azúcar blanco refinado, el mascabo conserva una cantidad significativa de melaza y minerales en su composición lo que pueden ser beneficiosos para la fermentación (Almeida, Mamede, & Magalhães-Guedes, 2023) y con respecto a la miel los antibióticos naturales que pueden estar presentes (Argenbio,2010), podrían inhibir el crecimiento y la actividad de las bacterias lácticas durante la fermentación, lo que podría resultar en un menor descenso de azúcares en comparación con las otras bebidas fermentadas. (Huybrechts, F., Mestdagh, E., & De Vuyst, L., 2020)

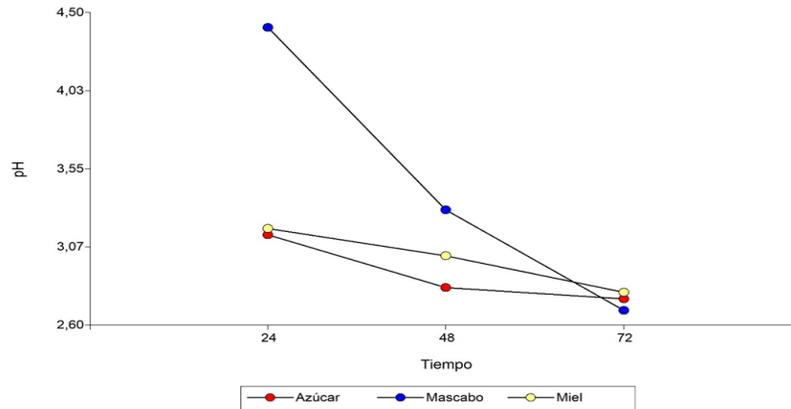


Figura N° 2

Cambio de pH a lo largo del tiempo(horas)

En el gráfico se puede visualizar la bebida elaborada con azúcar mascabo, inicia con un pH más alto (pH:4,43) en comparación con las otras dos variantes (miel: pH:3,18 - azúcar blanca: pH:3,14), sin embargo, a las 48 h. de fermentación, se observa un descenso de casi un punto, pero a las 72 h. se estabiliza el pH en las tres bebidas indicando que finalizan en una escala ácida. En cuanto a la cinética de las bebidas analizadas coinciden tal como lo describió (David Laureys *et al*, 2014) en su proyecto: “Diversidad de especies microbianas, dinámica comunitaria y cinética de metabolitos de la fermentación de kéfir” durante el proceso de fermentación, la sacarosa se consumió completamente después de las primeras 24 h. Esto coincidió con la producción del exopolisacárido del gránulo de kéfir de agua. El consumo de sacarosa dio lugar al aumento de las concentraciones de fructosa. Esto contrastó con la de glucosa que disminuyó continuamente durante la misma. En las primeras 72 h. de la fermentación, el pH disminuyó.

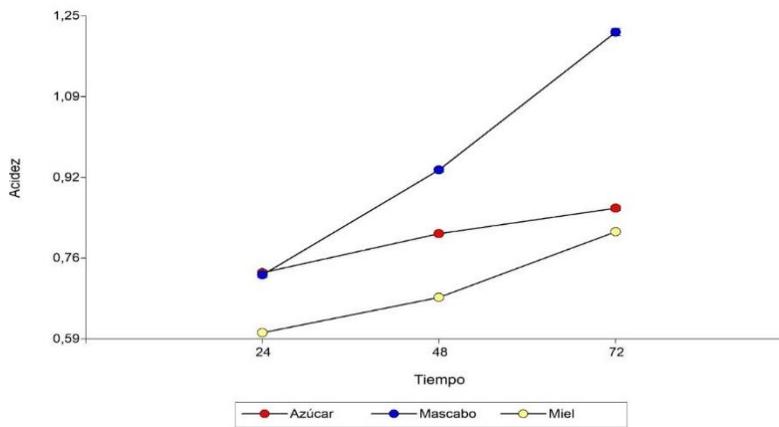


Figura N° 3

Cambio de acidez a lo largo del tiempo (horas)

En figura N° 3, se registran los niveles de acidez de las bebidas endulzadas con miel, azúcar blanca y azúcar mascabo en un período de 72 horas. Se puede observar que los valores de acidez varían en función del tipo de endulzante utilizado y del tiempo de fermentación. A las 24 horas, se aprecia que las bebidas endulzadas con azúcar mascabo y azúcar blanca inician casi en mismo punto de partida (nivel de acidez promedio: 0,72%). A las 48 h. Se observó un aumento generalizado de acidez en las tres bebidas elaboradas con diferentes endulzantes. Sin embargo a las 72 h. la bebida elaborada con mascabo alcanza el nivel más alto de acidez (1,2%), por ende coincide con la disminución de pH en esta bebida, que además por deducción propia y sin bibliografía que lo fundamente, esto puede deberse a lo anteriormente explicado, a que los gránulos del cultivo ya provenían de ser conservados en azúcar de mascabo, es decir, ya se encontraban adaptados al medio y no requirieron de tiempo para ello, aumentando así su biomasa día a día, lo que conlleva aún mayor consumo de azúcares y por ende un aumento en la acidez. Los resultados coinciden con lo demostrado por (Liu *et al*, 2019), el cual expuso que la acidez titulable del agua de kéfir fermentada puede variar según las condiciones de fermentación y el tiempo de maduración del producto. Valores típicos de acidez titulable suelen

estar en el rango de 0,5 a 1,2%, lo que refleja la presencia de ácido láctico producido durante la fermentación

Para explicar el comportamiento de los sólidos solubles (brix), el pH y la acidez durante la fermentación, se analizaron modelos lineales mixtos (**ver anexo III**) debido a que las mediciones realizadas son durante el transcurso de la fermentación. Estas mediciones se conocen como mediciones longitudinales y tienen la particularidad que no son independientes, por lo tanto, su tratamiento es específico a los modelos mixtos. La homocedasticidad se ve comprometida por el tiempo ya que esta es una variable influyente en todo proceso biológico y puede plantearse como un efecto aleatorio. (west, Welch y Galecki, 2015)

3.2. Análisis Microbilógico

Tabla 2. Recuento de Levadura ufc/ml

Tiempo (Horas)	Azúcar	Mascabo	Miel
24	1.5×10^2 ufc/ml	1.5×10^3 ufc/ml	2.2×10^3 ufc/ml
48	1.54×10^6 ufc/ml	1.5×10^6 ufc/ml	1.6×10^6 ufc/ml
72	2.06×10^7 ufc/ml	3.2×10^8 ufc/ml	2.5×10^7 ufc/ml

En esta tabla se muestran los recuentos de levaduras en unidades formadoras de colonias (ufc) durante un período de 72 horas de incubación de las bebidas de kéfir elaboradas con diferentes endulzantes (azúcar, mascabo y miel).

A las 24 horas, se observó que el recuento de levaduras es mayor en la bebida elaborada con miel, en comparación a las bebidas elaboradas con azúcar blanca y azúcar mascabo. A las 48 horas, se registró un aumento significativo en los recuentos de levaduras en las tres muestras. Pero a las 72 h. la bebida con azúcar mascabo dio el recuento más alto de ufc/ml de levaduras.

En comparación con el artículo Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano Monar(2014) donde explica que” Al utilizar miel como sustrato la concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el kéfir de agua ecuatoriano fue de 4×10^9 ufc/ml, y el recuento de levaduras fue de 3×10^7 ufc/ml. Por lo tanto, la bebida podría ser considerada probiótico debido a que excede la cantidad mínima de bacterias ácido lácticas requeridas que corresponde a (10^6 ufc/ml).

Tabla 3. Recuento de bacterias ácido lácticas ufc/ml

HORAS	Azúcar	Miel	Mascabo
24	9.28×10^2 ufc/ml	1.2×10^3 ufc/ml	2.4×10^3 ufc/ml
48	2.56×10^6 ufc/ml	1.85×10^6 ufc/ml	3.5×10^6 ufc/ml
72	2.59×10^7 ufc/ml	5.89×10^7 ufc/ml	6×10^7 ufc/ml

En esta tabla se presentan los recuentos de bacterias ácido lácticas en unidades formadoras de colonias (ufc) durante un período de 72 horas de incubación de las bebidas de kéfir elaboradas con diferentes endulzantes (azúcar, miel y mascabo).

A las 24 horas, se observó que el recuento de bacterias ácido lácticas es mayor en la bebida elaborada con azúcar mascabo. A las 48 horas, se registra un aumento significativo en el recuento de bacterias ácido lácticas en las tres variantes. A las 72 horas, se evidencia que en la bebida elaborada con azúcar mascabo presenta el recuento más alto. El mascabo, es un tipo de azúcar integral que se obtiene al procesar el jugo de caña de azúcar sin refinar. A diferencia del azúcar blanco refinado, el azúcar mascabo conserva una cantidad significativa de melaza y minerales en su composición que pueden ser beneficiosos para la fermentación, estudios como el de Fiorda, F. A. de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., *et al.*(2016)indican que los minerales presentes en azúcares menos refinados, como el mascabo, pueden influir

positivamente en la actividad fermentativa y en las propiedades probióticas del kéfir. Además, otro estudio realizado por Magalhães, K. T., Pereira, G. V. de M., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2010) demuestra que diferentes tipos de azúcares pueden afectar la composición microbiana y las propiedades químicas del kéfir, sugiriendo que azúcares más ricos en minerales pueden mejorar el perfil nutricional y probiótico de la bebidas; y con respecto a la miel los antibióticos naturales que pueden estar presentes, podrían inhibir el crecimiento y la actividad de las bacterias lácticas durante la fermentación, lo que podría resultar en un menor descenso de azúcares en comparación con las otras bebidas fermentadas.

El estudio de López et al. (2017) destaca la influencia de la composición del medio de cultivo en la selección de microorganismos en productos fermentados. En una solución elaborada con piña, la alta acidez y los azúcares específicos favorecieron el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* sobre *Lactobacillus*. Esto subraya la importancia de la matriz del sustrato en la configuración del perfil microbiano. Este hallazgo es coherente con el papel beneficioso de las bacterias ácido lácticas (BAL), reconocidas por sus efectos positivos en el tracto gastrointestinal debido a su actividad probiótica (Parra, 2010). Por su parte Tirado y Zambrano (2021) encontraron que el kéfir con biocompuestos de hierba luisa (***Cymbopogon citratus***) y chaya (***Cnidioscolus chayamansa***) tenía una alta densidad de microorganismos probióticos, con 1.7×10^9 UFC/mL. Esta alta carga microbiana indica un gran potencial probiótico del kéfir, mejorado por los biocompuestos añadidos.

Como los autores mencionan en sus investigaciones la presencia de bacterias ácido lácticas en una bebida utilizando kéfir de agua o leche son beneficiosos, cabe destacar que la carga es generalizada y para determinar específicamente la cepa se debe realiza un estudio preciso de la bacteria que se desea busca

A pesar de estas diferencias que se observan de manera descriptivas, en análisis estadístico no es significativo ($p > 0,05$). Se cumple la homocedasticidad con $p = 0,055$ pero no se cumple la normalidad, supuestos del análisis utilizado.

A continuación, se muestran imágenes de los resultados de microbiología



figura 4

Nota: Fotografía del campo microscópico donde se pueden observar las levaduras en plena gemación en la bebida elaborada con miel. Observación 100. (2) observación de las placas a simple vista del Crecimiento de las bacterias lácticas en medio MRS. (3) Imagen microscopio tinción de gram 1000



figura 1

Nota: Fotografía del campo microscópico donde se pueden observar las levaduras en plena gemación en la bebida elaborada con azúcar blanca. Observación 100. (2) observación de las placas a simple vista del Crecimiento de las bacterias lácticas en medio MRS. (3) Imagen microscopio tinción de gram 1000

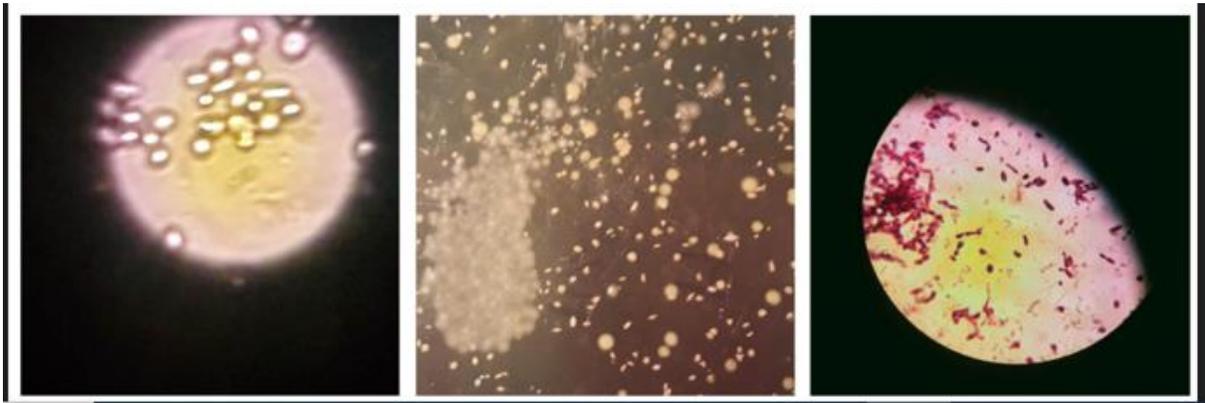


figura 2

Nota Fotografía del campo microscópico donde se pueden observar las levaduras en plena gemación en la bebida elaborada con mascabo. Observación 100. (2) observación de las placas a simple vista del Crecimiento de las bacterias lácticas en medio MRS. (3) Imagen microscopio tinción de gram 1000.

3.3. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS BEBIDAS FERMENTADAS

Las siguientes tablas presentan un análisis nutricional detallado de las bebidas fermentadas, cada una enriquecida con diferentes tipos de endulzantes: azúcar blanca, miel y azúcar mascabo. Este análisis permite comparar cómo cada endulzante influye en la composición nutricional y las propiedades de las bebidas fermentadas

Tabla 1
Análisis nutricional de la bebida con el agregado de azúcar blanca

Nutrientes cada 100 ml de bebida	DIA 1			Porción 200 ml Día 3 consumo	VD (*)
	DIA 1	Día 2	Día 3		
Carbohidratos (g)	7,60	6,18	5,82	12	4
Azúcares totales (g)	6,80	5,53	5,21	10	---
Azúcares añadidos(g)	6,72	5,46	5,14	10	---
Proteínas (g)	0,63	0,51	0,48	1,0	1
Grasas totales (g)	0,01	0,01	0,01	0,0	
Grasas saturadas (g)	0,00	0,00	0,00	0,0	
Grasas trans (g)	0,00	0,00	0,00	0,0	
Cenizas (g)	0,03	0,02	0,02		
Humedad (g)	91,31	92,94	93,35		
Fibra alimentaria (g)	0,42	0,34	0,32	0,6	3
Sodio (mg)	39	39	39	78	3
Valor energético kcal	33	27	25	51	3
Valor energético kJ	139	113	106	212	

Tabla 2
Análisis Nutricional de la bebida con el agregado de miel

Nutrientes cada 100 ml de bebida	DIA 1			Porción 200 ml Día 3 consumo	VD (*)
	DIA 1	Día 2	Día 3		
Carbohidratos (g)	6,12	6,08	5,96	12	4
Azúcares totales (g)	5,06	5,03	4,93	9,9	---
Azúcares añadidos(g)	4,98	4,95	4,85	9,7	---
Proteínas (g)	0,61	0,61	0,60	1,2	0
Grasas totales (g)	0,01	0,01	0,01	0,0	
Grasas saturadas (g)	0,00	0,00	0,00	0,0	
Grasas trans (g)	0,00	0,00	0,00	0,0	
Cenizas (g)	0,03	0,03	0,03		
Humedad (g)	92,83	92,87	93,01		
Fibra alimentaria (g)	0,40	0,40	0,39	0,8	3
Sodio (mg)	40	40	40,00	80	3
Valor energético kcal	27	27	26	53	3
Valor energético kJ	113	113	11	221	

Tabla 3
Análisis Nutricional de la bebida con el agregado de mascabo

Nutrientes cada 100 ml de bebida	Días de consumo			Porción 200 ml	VD (*)
	DIA 1	Día 2	Día 3	Día 3 consumo	
Carbohidratos (g)	6,30	4,80	3,30	6,6	2
Azúcares totales (g)	5,64	4,29	2,95	5,9	---
Azúcares añadidos(g)	5,57	4,24	2,92	5,8	---
Proteínas (g)	0,52	0,40	0,27	0,5	1
Grasas totales (g)	0,01	0,00	0,00	0,0	
Grasas saturadas (g)	0,00	0,00	0,00	0,0	
Grasas trans (g)	0,00	0,00	0,00	0,0	
Cenizas (g)	0,02	0,02	0,01		
Humedad (g)	92,80	94,51	96,23		
Fibra alimentaria (g)	0,35	0,27	0,18	0,4	1
Sodio (mg)	39	39	39	78	3
Valor energético kcal	27	21	14	29	1
Valor energético kJ	115	87	60	120	

Haciendo un análisis de cada uno de los nutrientes y el valor energético, que se informan en las tablas 7, 8 y 9 podemos determinar lo siguiente:

El aporte energético es extremadamente bajo en el caso de la bebida realizada con azúcar Mascabo y el doble en las de azúcar común y miel. Pero de todas maneras en los tres casos es prácticamente despreciable, lo cual se comprueba con el porcentaje de requerimiento diario que cubren. El aporte de sodio es el mismo en los tres casos porque corresponde al que aporta el agua con las que fueron preparadas.

La fibra es aportada por las pasas de uva presente en la formulación de las bebidas, la misma disminuye en el tiempo porque se fermenta la parte de fibra soluble (fermentable) de las pasas, siendo mayor esta disminución en el caso del azúcar Mascabo, (porque justamente tiene fibras propias del mascabo). En todos los casos la humedad se incrementa levemente en la medida que los azúcares son fermentados.

El aporte de cenizas es despreciable en todos los casos. No aporta ningún tipo de grasas. Las proteínas son aportadas por los mismos microorganismos, por las pasas y por la miel, lo mismo el aporte es muy bajo, en todos los casos, manteniéndose en la que está elaborada con miel, porque es la que la que aporta en mayor proporción.

Los azúcares totales están formados por los azúcares propios del producto (en este caso pasas de uva) más los azúcares añadidos: azúcar blanca, miel o azúcar Mascabo, lógicamente siempre los azúcares totales son mayores o iguales a los añadidos, en todos los alimentos que se consumen.

A continuación, se realiza un análisis de los carbohidratos totales: conformados por los azúcares totales y los azúcares propios de la estructura de las pasas de uvas.

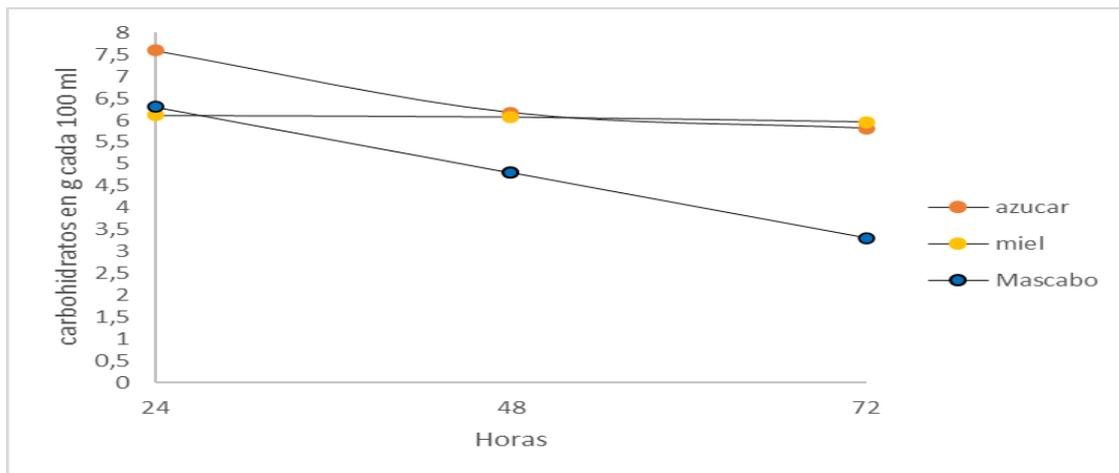


figura 3
Variación de carbohidratos en g/100 ml vs horas

En la figura N° 7 se puede observar que, al comparar las tres líneas en el gráfico, cambia el contenido de carbohidratos en cada una de las bebidas fermentadas a medida que avanza la fermentación. Esto permitirá visualizar y comparar la capacidad de los microorganismos en fermentar los azúcares presentes (azúcar mascabo, miel y azúcar blanca) en la fermentación.

Los microorganismos presentes en los granos de kéfir metabolizan los azúcares presentes en la bebida, lo que resulta en una disminución del contenido de carbohidratos a lo largo del tiempo. Por último, se confirmó que el comportamiento nutricional de las bebidas se vio afectado por los diferentes endulzantes utilizados. En el perfil nutricional de la bebida con el agregado de miel si bien se produjo la fermentación, prácticamente no varía por lo que se puede deducir que tiene inhibidores propios que hacen que sea un producto que dure más en el tiempo, como lo explica Mandal et,al, (2011); con respecto al perfil nutricional de la bebida con el agregado de mascabo no deja de ser azúcar pero a diferencia de la azúcar blanca lo que tiene son trazas de minerales y vitaminas propio del jugo de la caña que favorece multiplicación de levaduras y bacterias, por lo que esa carga microbiana se ve reflejada en el aporte de proteína, que al cabo de 72 horas se puede observar que tanto proteína como fibras dan 0g, ya que ambos resultados dan igual o menor que 0,5 g.

A continuación, se adjuntaron rótulos de agua de kéfir elaborados en forma industrial para llevar a cabo una comparación con los resultados de la investigación.



Información nutricional. Valores medios por 100 ml	
nutritional Value per 100 ml-Declaração nutricional.	
res médios por 100 ml-Wartość odżywcza w 100 ml	
Energético	136 kJ
Energía value-Energia-Wartość energetyczna	32 kcal
Grasas totales-Total fat-Lípidos-Tłuszcz	<0,1 g
Grasas saturadas	<0,1 g
Grasas saturadas	<0,1 g
Hidratos de carbono-Carbohydrates-Węglowodany	7,9 g
Hidratos de carbono	7,9 g
Azúcares	6,7 g
Azúcares	6,7 g
Proteínas-Proteins-Białko	0,1 g
Proteínas	0,1 g
Sal-Sól	0,03 g
Sal	0,03 g

Kéfir Aqua se unen al sabor y propiedades milenarias del

Información nutricional	Como se vende por 100 g / 100 ml
Energía	96 kJ (23 kcal)
Grasas	0,6 g
Grasas saturadas	0,5 g
Hidratos de carbono	2,5 g
Azúcares	1,6 g
Fibra alimentaria	?
Proteínas	1,9 g
Sal	?





Información nutricional	Como se vende por 100 g / 100 ml
Energía	63 kj (15 kcal)
Grasas	0 g
Grasas saturadas	0 g
Hidratos de carbono	3,2 g
Azúcares	3,2 g
Fibra alimentaria	?
Proteínas	0,3 g
Sal	0,3 g



Información nutricional	Como se vende por 100 g / 100 ml
Energía	25 kj (6 kcal)
Grasas	0,5 g
Grasas saturadas	0,5 g
Hidratos de carbono	1,5 g
Azúcares	1,5 g
Fibra alimentaria	?
Proteínas	1 g
Sal	?

Por lo que se llegó a la conclusión que con respecto a los diferentes productos que hay en el mercado, se puede observar que la información nutricional varía según los ingredientes utilizados y que las tres bebidas elaboradas se asemejan al producto marca Cantero de Leteur

CAPÍTULO IV: CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio ha demostrado de manera concluyente que la elección del endulzante tiene un impacto significativo en las características químicas, microbiológicas y nutricionales de las bebidas fermentadas con gránulos de kéfir en agua. Los resultados obtenidos ofrecen una comprensión más profunda de cómo los endulzantes pueden influir en estas bebidas. Considerando la carga probiótica obtenida al final de fermentación la bebida con mayor presencia de bacteria lácticas es la endulzada con azúcar mascabo. Estos hallazgos son relevantes para los consumidores, ya que si bien estas bebidas son consideradas beneficiosas por otro lado al observar los perfiles nutricionales deberían llevar octógonos por exceso en azúcar y en sodio. La información brindada es clave para el desarrollo de productos fermentados de calidad con perfiles específicos que se ajusten a las preferencias del consumidor

Anexo N° I

VISTO el expediente EX-2021-18020713- -APN-DLEIAER#ANMAT; y CONSIDERANDO: Que la Sra. Florencia Quiñoy solicitó a la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) la inclusión del kéfir de Agua al Código Alimentario Argentino (CAA). Que el kéfir de agua, también llamado acquaKefir o sugary Kéfir, es una bebida fermentada de uso ancestral y que se consume a nivel mundial en países como Estados Unidos, México, Canadá, Japón, Tailandia, Malasia, Francia, Grecia, Turquía, Brasil, entre otros. Que, como antecedente, el kéfir de leche se encuentra contemplado en el Artículo 576 del CAA. Que la Comisión dio intervención al Grupo de Trabajo ad hoc “Criterios Microbiológicos”, coordinado por el Instituto Nacional de Alimentos (INAL), para su evaluación y que dicho grupo convocó a trabajar en conjunto al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de La Plata (CIDCA - UNLP), al Instituto de Lactología Industrial del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INLIN – CONICET) de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, al Laboratorio Nacional de Referencia del INAL y contó con el aporte de elaboradores de Kéfir de agua nacionales. Que el mencionado Grupo realizó ensayos sobre numerosas muestras de productos y elevó a la CONAL la propuesta de caracterización de microorganismos específicos y de criterios microbiológicos del producto. Qué, asimismo, la Comisión acordó remitir el proyecto al Grupo de trabajo de Metodología Analítica Oficial con el objetivo de establecer parámetros fisicoquímicos y dicho Grupo elevó el informe pertinente con el cual la CONAL acordó. Que en el proyecto de resolución tomó intervención el Consejo Asesor de la CONAL (CONASE) y se sometió a consulta pública. Que la CONAL ha intervenido expidiéndose favorablemente. Que los Servicios Jurídicos Permanentes de los organismos involucrados han tomado la intervención de su competencia. Que se actúa en virtud de las

facultades conferidas por los Decretos Nros. 815 del 26 de julio de 1999; 7 del 10 de diciembre de 2019 y 50 del 19 de diciembre de 2019, sus modificatorios y complementarios. Por ello, EL SECRETARIO DE CALIDAD EN SALUD Y EL SECRETARIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA y PESCA RESUELVEN: ARTÍCULO 1º.- Incorporarse el Artículo 1084 tris al Capítulo XIII: “Bebidas Fermentadas”, del Código Alimentario Argentino, el que quedo redactado e incorporado el 14/08/2024 de la siguiente manera: “Artículo 1084 tris: Se entiende como Kéfir de agua a la bebida obtenida a partir de la fermentación de gránulos de kéfir en agua azucarada de la cual se han retirado los nódulos (cultivo iniciador). La bebida podrá ser adicionada con jugos o pulpas de fruta, extractos vegetales, especias, frutas secas, miel u otros ingredientes permitidos en el presente Código. De acuerdo al proceso de elaboración, la bebida podrá presentar turbidez en el producto final. Los microorganismos específicos del kéfir utilizado como cultivo iniciador deben ser viables y activos en el producto final durante su período de validez, dentro del siguiente rango de recuento:

Recuento de Microorganismos específicos

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Metodología de referencia ⁽¹⁾
Recuento de bacterias ácido lácticas (UFC/ml)	Mínimo 10 ⁶	ISO 15214
Recuento de levaduras (UFC/ml)	Mínimo 10 ⁵	ISO 21527 -1

Su versión más actualizada. Pueden emplearse otros métodos debidamente validados (por ejemplo, basándose en la Norma ISO 16140) La bebida deberá cumplir los siguientes Criterios Microbiológicos:

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Caso ICMSF	Metodología de referencia ⁽¹⁾
Enterobacterias (UFC/ml)	n=5, c=0, m=10	4	ISO 21528- 2

Su versión más actualizada. Pueden emplearse otros métodos debidamente validados (por ejemplo, basándose en la Norma ISO 16140) La bebida deberá cumplir los siguientes Parámetros Analíticos:

Parámetro	Mínimo	Máximo
pH	3	4.5
Grado Alcohólico (% vol. a 20°C)	-	3

Todos los establecimientos que elaboren, industrialicen y/o fraccionen estos productos deberán implementar un Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) de acuerdo con las directrices que se establecen en el Artículo 18 bis del presente Código y contar con un director técnico. La bebida se denominará “Bebida fermentada a base de kéfir de agua”; cuando la bebida sea adicionada de otros ingredientes, se denominará “Bebida fermentada a base de Kefir de agua con (...)”, seguido del o de los ingredientes añadidos después de la fermentación: jugo, pulpa, especias, extracto vegetal, miel u otros. Cuando se utilicen además aromatizantes/ saborizantes se denominará “Bebida fermentada a base de kéfir de agua saborizada/aromatizada con (...)” completando con el nombre del aromatizante / saborizante utilizado. El producto debe ser conservado refrigerado hasta su consumo y deberá indicar en el rótulo la temperatura de conservación de acuerdo con el presente código. El producto deberá indicar claramente que no se recomienda su consumo para niños menores de 6 años.”

ARTÍCULO 2°. - La presente Resolución entrará en vigencia al día siguiente de su publicación en

el BOLETÍN OFICIAL DE LA REPÚBLICA ARGENTINA. ARTÍCULO 3°. - Comuníquese,
publíquese, dése a la DIRECCIÓN NACIONAL DEL REGISTRO OFICIAL y archívese

Anexo N° II

Artículo 1389 - (Resolución Conjunta SPReI N° 261/2011 y SAGyP N° 22/2011) Con la denominación de Probióticos, se entiende los microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del consumidor. Para que una cepa pueda ser utilizada como ingrediente probiótico para alimentos deberá cumplir con el siguiente protocolo de Evaluación de un Probiótico como ingrediente para Alimentos

Requisitos Mínimos

1. La cepa debe ser identificada (Género/especie/subespecie) por laboratorios reconocidos mediante tecnologías validadas.
2. Se debe realizar una caracterización “*in vitro*” e “*in vivo*” mediante ensayos de resistencia gástrica, a bilis y a lisozima de modo tal que se asegure la resistencia de la cepa a las barreras biológicas del organismo.
3. El(los) efecto(s) probiótico(s) adjudicado(s) a la cepa deben ser constatados mediante ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*”. Estos deben ser debidamente documentados y respaldados con estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos.
4. Se debe demostrar la seguridad de la cepa probiótica (no debe ser riesgosa para la salud y no deberá presentar o promover la translocación bacteriana) en las concentraciones en que se encuentra en el alimento. Específicamente, se debe constatar que la/s cepas no son portadora de genes de resistencia a antibióticos, no presentan factores de virulencia responsable de actividad hemolítica y no producen

Además, se realizarán las pruebas complementarias descriptas en el punto II.

II. Pruebas Complementarias para Garantizar la Seguridad de la Cepa

- Resistencia a antibióticos: ensayo realizado como indicador de la presencia de cepas portadoras de genes de resistencia. Visto que la diseminación de antibiótico-resistencia puede reducir las posibilidades terapéuticas en enfermedades infecciosas, se deberá determinar la presencia de resistencia transferible en cepas que serán usadas para consumo humano. Las cepas no deberán ser portadoras de genes de resistencia a antibióticos.

- Actividad hemolítica: ensayo realizado como indicador de la presencia del factor de virulencia responsable de actividad hemolítica. Dicho factor es utilizado principalmente por ciertos microorganismos como fuente de hierro, motivo por el cual causa anemia y edema. Deberá estar ausente en bacterias probióticas.

- Producción de toxinas: las cepas probióticas no deberán producir toxinas. La toxicidad de las cepas hacia la mucosa del tracto gastrointestinal es considerada un importante aspecto de seguridad. La toxicidad aguda se determina comúnmente en ratones, durante el ensayo en el cual se suministra a los animales una determinada dosis de bacterias (equivalente a la dosis que contendrá el alimento) se observan diariamente posibles cambios en la actividad y comportamiento de los mismos. Después del ensayo, los animales son sacrificados para detectar existencia de cambios patológicos visibles en órganos (estómago, porción dista del ileum, cecum y colon).

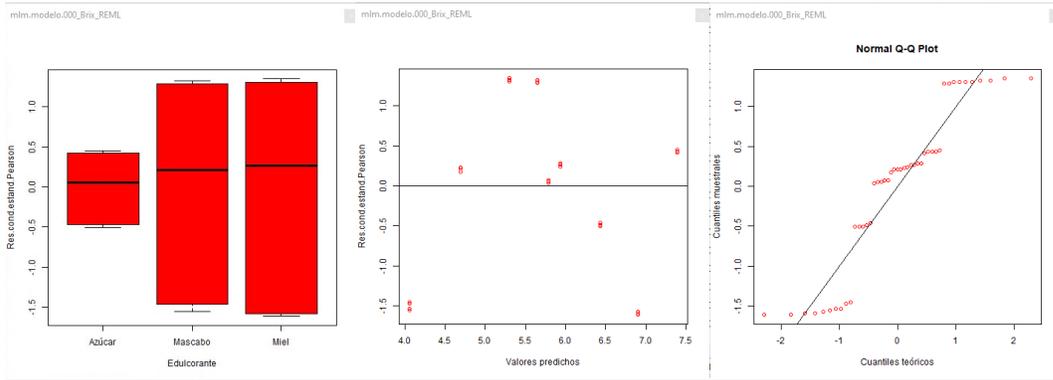
III. Identificación Comercial de la(s) Cepa(s) El producto se presentará comercialmente en un envase bromatológicamente apto cuyo rótulo indique la identificación precisa de la(s) cepa(s) que lo componga(n) y la concentración de células viables de cada una de ellas (UFC/g) Con la denominación de Alimento con Probióticos, se entiende aquel alimento con una carga de

células viables que deberá estar comprendida entre 10^6 y 10^9 UFC/g durante su período de duración mínima. El producto se rotulará: "... con probióticos" llenando el espacio en blanco con la denominación de venta del alimento correspondiente. Los alimentos elaborados con probióticos

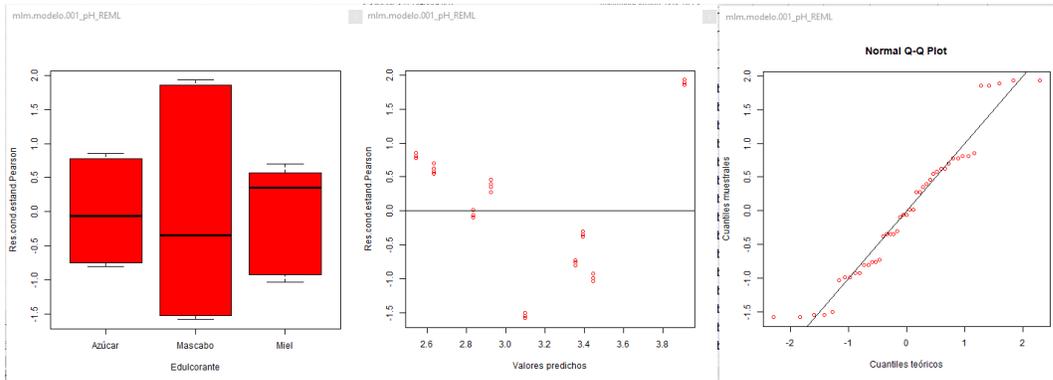
serán autorizados, previa evaluación satisfactoria de los ensayos "in Vivo" con el alimento tal cual se va a consumir, que demuestren la funcionalidad que se le atribuye a la(s) cepa(s) probiótica(s) que contiene, de una Comisión Evaluadora integrada por profesionales especializados pertenecientes a la Autoridad Sanitaria o a los que ésta designe a ese efecto para cada caso particular. La Comisión Evaluadora determinará si es necesario la repetición de los ensayos "in Vivo" para aquellos alimentos en los cuales se demuestre que una modificación en la composición del alimento, sobre el cual se llevaron a cabo los ensayos "in Vivo", no altera el o los efectos probióticos que se intentan demostrar.

Anexo III

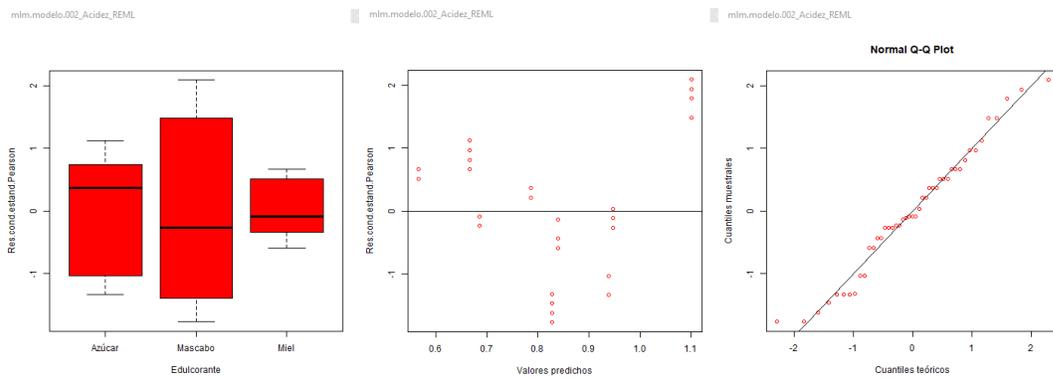
Diagnóstico modelos mixtos Brix con función identidad



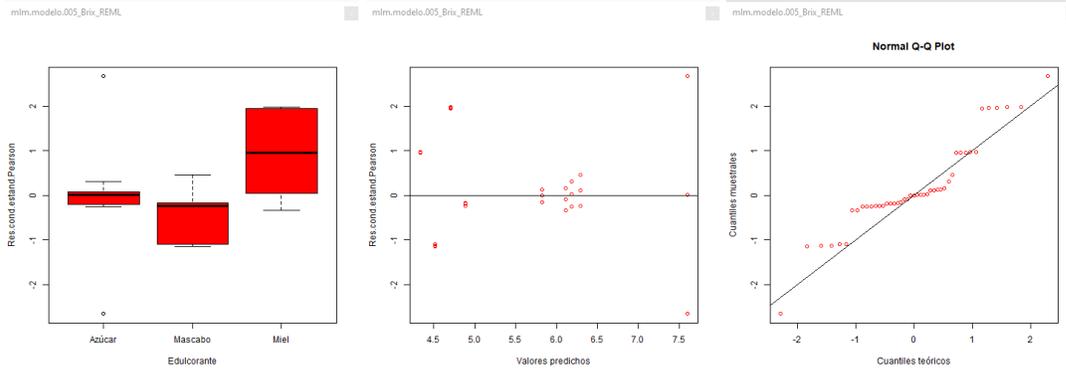
Diagnóstico modelos mixtos pH con función identidad



Diagnóstico modelos mixtos acidez con función identidad



Diagnóstico modelos mixtos °Brix con función fija



Modelos lineales generales y mixtos

Especificación del modelo en R

```
mlm.modelo.000_Brix_REML<-lme(Brix~1+Edulcorante
,random=list(Tiempo=pdIdent(~1))
,method="REML")
,control=lmeControl(niterEM=150
,msMaxIter=200)
,na.action=na.omit
,data=mlm.modeloR.data00
,keep.data=FALSE)
```

Resultados para el modelo: mlm.modelo.000_Brix_REML

Variable dependiente: Brix

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0	R2	1
45	89,58	98,27	-39,79	0,52	0,43	0,80		

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	40	148,32	<0,0001
Edulcorante	2	40	44,37	<0,0001

Pruebas de hipótesis marginales (Empty)

Efectos fijos

	Estim	E.E.	gl	T	p-valor
(Intercept)	6,54	0,49	40	13,39	<0,0001
EdulcoranteMascabo	-1,73	0,19	40	-9,14	<0,0001
EdulcoranteMiel	-0,49	0,19	40	-2,58	0,0137

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent
Formula: ~1 | Tiempo

Desvíos estándares y correlaciones

	(Intercept)
(Intercept)	1,57

Coefficientes (BLUP) de los efectos aleatorios (Tiempo)

	(Intercept)
24	0,85
48	-0,11
72	-0,74

Especificación del modelo en R

```
mlm.modelo.001_pH_REML<-lme(pH~1+Edulcorante
,random=list(Tiempo=pdIdent(~1))
,method="REML"
,control=lmeControl(niterEM=150
,msMaxIter=200)
,na.action=na.omit
,data=mlm.modeloR.data00
,keep.data=FALSE)
```

Resultados para el modelo: **mlm.modelo.001_pH_REML**
Variable dependiente: pH

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0	R2	1
45	36,92	45,61	-13,46	0,28	0,24	0,72		

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	40	164,61	<0,0001
Edulcorante	2	40	17,20	<0,0001

Pruebas de hipótesis marginales (Empty)

Efectos fijos

	Estim	E.E.	gl	T	p-valor
(Intercept)	2,91	0,25	40	11,61	<0,0001
EdulcoranteMascabo	0,56	0,10	40	5,47	<0,0001
EdulcoranteMiel	0,09	0,10	40	0,89	0,3774

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent
Formula: ~1 | Tiempo

Desvíos estándares y correlaciones

_____ (Intercept)

(Intercept) 1,49

Coefficientes (BLUP) de los efectos aleatorios (Tiempo)

(Intercept)	
24	0,44
48	-0,08
72	-0,37

Especificación del modelo en R

```
mlm.modelo.002_Acidez_REML<-lme(Acidez~1+Edulcorante
,random=list(Tiempo=pdIdent(~1))
,method="REML")
,control=lmeControl(niterEM=150
,msMaxIter=200)
,na.action=na.omit
,data=mlm.modeloR.data00
,keep.data=FALSE)
```

Resultados para el modelo: mlm.modelo.002_Acidez_REML
Variable dependiente: Acidez

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0	R2	1
45	-78,28	-69,59	44,14	0,07	0,40	0,85		

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	40	103,21	<0,0001
Edulcorante	2	40	54,03	<0,0001

Pruebas de hipótesis marginales (Empty)

Efectos fijos

	Estim	E.E.	gl	T	p-valor
(Intercept)	0,80	0,08	40	9,74	<0,0001
EdulcoranteMascabo	0,16	0,03	40	6,37	<0,0001
EdulcoranteMiel	-0,10	0,03	40	-3,93	0,0003

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent
Formula: ~1 | Tiempo

Desvíos estándares y correlaciones

	(Intercept)
(Intercept)	1,98

Coefficientes (BLUP) de los efectos aleatorios (Tiempo)

	(Intercept)
24	-0,13
48	-0,01
72	0,14

ANAVA RAS RECUENTO

C:\Users\Operador\OneDrive\Documentos\Facultad\Tesis\Laura Cia\Datos Laura Cia_Datos_2 : 16/2/2023 - 09:43:15 - [Versión : 30/4/2020]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Recuento	18	0,32	0,23	91,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	814226062,57	2	407113031,28	3,54	0,0550
Edulcorante	814226062,57	2	407113031,28	3,54	0,0550
Error	1723896216,04	15	114926414,40		
Total	2538122278,60	17			

ANAVA RECUENTO RTE

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Recuento	18	0,26	0,04	308,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

E.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2389305158,67	4	597326289,67	1,15	0,3750
Edulcorante	1091591084,33	2	545795542,17	1,05	0,3763
Tiempo	1297714074,33	2	648857037,17	1,25	0,3177
Error	6727498449,83	13	517499880,76		
Total	9116803608,50	17			

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RE Recuento	18	0,00	1,03	0,82	0,0030

Análisis de la varianza

RABS Brix

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Brix	45	0,34	0,31	61,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,27	2	0,63	10,69	0,0002
Edulcorante	1,27	2	0,63	10,69	0,0002
Error	2,49	42	0,06		
Total	3,76	44			

RABS pH

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS pH	45	0,28	0,25	57,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,26	2	0,13	8,19	0,0010
Edulcorante	0,26	2	0,13	8,19	0,0010
Error	0,67	42	0,02		
Total	0,93	44			

RABS Acidez

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Acidez	45	0,28	0,24	63,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	2	0,01	8,10	0,0011
Edulcorante	0,02	2	0,01	8,10	0,0011
Error	0,05	42	1,2E-03		
Total	0,07	44			

Bibliografía

- Adams, M. R., & Moss, M. O. (1997). Actividades metabólicas de los probióticos. *Food Microbiology*, 10(2), 97-108.
- Almeida, R. C. de C., Mamede, M. E. de O., & Magalhães-Guedes, K. T. (2023). Non-conventional sucrose-based substrates: Development of non-dairy kefir beverages with probiotic potential. *Fermentation*, 9(4), 384. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040384>
- Argenbio. (s.f.). Antibióticos naturales y su influencia en la fermentación de bebidas probióticas. En *Biología y Microbiología Alimentaria* (pp. 45-58).
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (3rd ed., pp. 1-66). Marcel Dekker.
- Bernal Castro, C. A., Díaz-Moreno, C., & Gutiérrez-Cortés, C. (2017). *Alimento Funcional*.
- Bernal Castro, C. A., Díaz-Moreno, C., & Gutiérrez-Cortés, C. (2017). Alimentos funcionales. En *Alimentos funcionales: concepto, historia y desarrollo* (pp. 45-62). Editorial Nutrición y Salud.
- Bernal Castro, Camila Andrea, Díaz-Moreno, Consuelo, & Gutiérrez-Cortés, Carolina. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas Probiotics and prebiotics in vegetable matrices: Obtenido de *Revista chilena de nutrición* 44(4), 383-392:
- Crane, E. (1990). *Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Resources*. Heinemann Newnes. doi:10.1007/978-1-4615-6165-2
- Farnworth, E. R. (2005). Kefir-a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1), 1-17. doi:10.1616/1476-2137.13919
- Ferrari, A. M., Fiorda, F. A., & Sant'Anna, E. S. (2020). Water kefir: An ancient fermented beverage, a source of probiotics, and its health benefits. *Journal of Food Science and Technology*, 57(12), 4299-4307. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04572-1>

- Florian W. Waldherr, Viktoria M. Doll, Daniel Meißner, & Rudi F. Vogel. (2010). Origen de los gránulos de kéfir de agua. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(11), 1013-1017.
- Florian W. Waldherr, Viktoria M. Doll, Daniel Meißner, Rudi F. Vogel. (2010). Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. En *Food Microbiology* (págs. 672-678). Technische Universität München, Technische Mikrobiologie, Weihenstephaner Steig 16, D-85350 Freising, Germany: Volume 27, Issue 5.
- Florian W. Waldherr, Viktoria M. Doll, Daniel Meißner, Rudi F. Vogel (2010). El origen de los gránulos de kéfir de agua. National Center for Biotechnology Information.
- García Torres, J., & Hernandez de Bermudez, R. (2015). Kéfir y salud intestinal. *Revista de Nutrición Clínica y Metabolismo*, 18(3), 143-157.
- García Torres, J., Hernandez de Bermudez, R. (2015). Fermentación de leche descremada UHT a partir de gránulos de kéfir. Universidad de El Salvador. San Salvador. El Salvador: trabajo de Grado.
- García Torres, J., Hernandez de Bermudez, R. (2015). Investigación sobre las bebidas fermentadas y su impacto en la salud intestinal. *Revista de Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 35(2), 63-72.
- Guarner, F., & Schaafsma, G. (1998). Definición de probióticos. *Revista de Gastroenterología de México*, 63(4), 230-234.
- Havenaar, R., & Huis, J. (1992). Propuesta de definición de probióticos. *Food Research International*, 25(3), 199-203.
- Havenaar, R., & Huis, J. in't. (1992). Probiotics: a general view. In *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (pp. 151-170). CRC Press.
- Horisberger, M. (1969). Microbiota del kéfir y su relación con el origen geográfico. *Journal of Fermentation Technology*, 47(7), 531-537.

- Huybrechts, F., Mestdagh, E., & De Vuyst, L. (2020). Antimicrobial Activity of Honey Against Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology*, 86, 103330. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103330>
- Ikram-ul-hag, A., & Ali, S. (2020). Probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from traditionally prepared local yogurt. *African Journal of Microbiology Research*, 14(8), 448-456.
- Ikram-ul-hag, A., & Ali, S. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación del kéfir de agua. *Journal of Food Science*, 75(4), 291-303.
- Jay, J. (1994). Levaduras en el kéfir de agua. *Microbiology and Food Safety*, 21(3), 134-139.
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Bacterias presentes en el kéfir de agua. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 1-8.
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2564-2572.
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2017). Functional properties of water kefir: a review. *Food Microbiology*, 66, 150-161.
- Laureys, D., Aerts, M., Vandame, P., & De vuyst, L. (2018). Procedimiento de elaboración del kéfir de agua. *Journal of Food Engineering*, 45(3), 215-221.
- Laureys, D., Johnson, S., & Smith, P. (2014). Diversity of microbial species and metabolite kinetics in kefir fermentation. *Journal of Food Science*, 89(3), 567-578. DOI: 10.1111/food.12000
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2019). The buffer capacity and calcium concentration of water influence the microbial species diversity, grain growth, and metabolite production during water kefir fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02876>
- Liu, X., Wang, Y., & Zhang, Z. (2019). Variation in titratable acidity during kefir water fermentation. *Food Chemistry*, 245, 1123-1130. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.02.025

- López, R. (2016). Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. *Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 5(2), 45-56.
- Lynch, K. M., Wilkinson, S., & Daenen, L. (2021). Producción industrial de kéfir de agua. *Journal of Industrial Fermentation*, 39(2), 87-95.
- M.F. Juárez-Chairez, Y. T. Gallardo-Navarro. (2018). Desarrollo de una bebida de almendra adicionada con *Lactobacillus brevis* Lb9HPTA-120751. Gustavo A. Madero, Lindavista, 07738 Ciudad de México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, Unidad Profesional Adolfo López Mateos Edificio N° 7.
- Magalhaes, K. T., Pereira, G. V., Días, D. R., & Schwan, R. F. (2010). Producción de exopolisacáridos durante la fermentación de kéfir de agua. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1417-1425.
- Magalhaes, K. T., Pereira, G. V. de M., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2010). Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 735-746. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300028>
- Metchnikoff, E. (1907). *Essais optimistes*. Paris, France: P. Ollendorff.
- Metchnikoff, E. (1907). Estudios sobre la flora intestinal y el efecto de los lácteos fermentados. Nobel Lecture.
- Monar, A., Martínez, M., & Gómez, L. (2014). Impacto de diferentes tipos de endulzantes en la fermentación del agua de kéfir. *Revista Internacional de Microbiología Aplicada*, 20(3), 112-125.
- Monroy, A., García, B., & Pérez, C. (2016). Análisis de la fermentación en bebidas de kéfir: influencia de los endulzantes. *Revista de Ciencias de los Alimentos*, 8(1), 78-89.
- Morrissey, W. F., Davenport, B., Querol, A., & Dobson, A. D. W. (2004). Levaduras en el kéfir de agua. *Yeast Research*, 30(6), 755-768.
- National Honey Board. (2012). *Honey: A Reference Guide to Nature's Sweetener*. Retrieved from <https://www.honey.com>

- Parra, M. R. (2010). Beneficios de las bacterias ácido lácticas en alimentos fermentados. *Revista de Nutrición*, 18(2), 89-102.
- Pennington, J. A. T. (2002). *Bowes and Church's Food Values of Portions Commonly Used* (18th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Pidoux, M. (1989). Producción de ácido láctico por bacterias ácido lácticas en el kéfir de agua. *Journal of Fermentation Science*, 20(3), 197-203.
- Leroi, F., & Pidoux, M. (1993). Characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*, 74(4), 329-335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03003.x>
- Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011. (2011). Uso de probióticos en alimentos. *Boletín Oficial de la República Argentina*, 15(2), 54-56.
- Rodríguez, R. (2010). *Procesamiento de la caña de azúcar: Manual para pequeños productores*. FAO. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/013/i1912s/i1912s.pdf>
- Rubio, M. T., Lappe, P., Wachter, C., & Ulloa, M. (1993). Impacto del origen geográfico en la microbiota de los granos de kéfir. *Journal of Microbial Ecology*, 26(4), 287-294.
- Rubio, M. T., Lappe, P., Wachter, C., & Ulloa, M. (1993). Microbiota present in the water kefir grain (Tibicos). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 35(3), 235-240.
- Teixeira, J. S., McNeill, V., & Gänzle, M. G. (2010). Levansucrase and sucrose phosphorylase contribute to raffinose, stachyose, and verbascose metabolism by lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1417-1425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x>
- Texeira, L. M., Aerts, M., Vandame, P., & De Vuyst, L. (2010). Interacción entre bacterias ácido lácticas y levaduras en el kéfir de agua. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1807-1817.
- Tirado, D., & Zambrano, D. (2021). Microbiological analysis of kefir water with herbal compounds: A case study of lemongrass and chaya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(4), 2456-2465. DOI: 10.1021/jf200250t

- Van der Poel, P. W., Schiweck, H., & Schwartz, T. (1998). Sugar Technology: Beet and Cane Sugar Manufacture. Springer. doi:10.1007/978-3-642-58869-7
- Waldherr, F. W., Doll, V. M., Meißner, D., & Vogel, R. F. (2010). Origin of water kefir grain polysaccharides: Microbial fermentation diversity of water kefir. Food Microbiology, 27(2), 185-19
- West, B. T., Welch, K. B., & Galecki, A. T. (2015). Linear mixed models: A practical guide using statistical software (2nd ed.). Thousand Oaks, CA: Sage Publications.