



UNIVERSIDAD DE SANCTI SPÍRITUS
“José Martí Pérez”



Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Agronomía

CARRERA INGENIERÍA EN PROCESOS AGROINDUSTRIALES

TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE INGENIERO EN PROCESOS
AGROINDUSTRIALES

MIEL FINAL DE CAÑA DE AZÚCAR COMO SUSTRATO PARA LA
MULTIPLICACIÓN DE LOS GRÁNULOS DEL KÉFIR DE AGUA.

Autor: Miguel Felipe Berrueta Jiménez

Tutores: Dr. C. Juan Emilio Hernández García

MSc. Melissa Portal Alonso

Dra. M.V.Z. Beatriz de la Caridad González Socarrás

Sancti Spíritus, 2024

Copyright©UNISS

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez”, y se encuentra depositado en los fondos del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación “Raúl Ferrer Pérez” subordinada a la Dirección de General de Desarrollo 3 de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su publicación bajo la licencia siguiente:

Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Derivar 4.0 Internacional

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con: Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación “Raúl Ferrer Pérez”. Comandante Manuel Fajardo s/n, Olivos 1. Sancti Spíritus. Cuba. CP. 60100 Teléfono: 41-334968

Frase:

“Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía. Para determinar un gran proyecto hace falta perseverancia”

By Cristina Castro Rodríguez

Agradecimiento

Agradezco a Dios por brindarme salud y vida, por ser ese refugio en mis momentos de soledad y brindarme siempre una salida para continuar. Gracias por la oportunidad de conocer grandes amigos y vivir momentos inolvidables. Un agradecimiento de todo corazón al Dr. Juan Emilio por ayudarme a realizar y culminar mi tesis, por ser una persona amable, con una calidad humana inigualable, por su paciencia y tiempo. A todas esas personas que confiaron en mí y siempre fueron una guía para continuar estudiando.

Dedicatoria

Dedico con todo mi corazón mi tesis a mí madre Jaqueline, por brindarme su apoyo incondicional, por ser mi guía en los momentos más difíciles y brindarme todo su amor, todo lo que soy es gracias a su paciencia, sus consejos y sobre todo su apoyo. Siempre serás mi inspiración y mis ganas de seguir luchando. Agradezco a todos mis amigos en especial Abner y parte de mi familia por estar a mi lado en todos los buenos y malos momentos, por brindarme sus sabios consejos y su cariño. A mi linda hermana, Elizabeth por ser el ser más maravilloso de todos, por darme todo su amor y cariño, y acompañarme en este proceso de estudios, por todas las malas noches que ha pasado conmigo, te agradezco por ser incondicional en mi vida. Me agradezco AMÍ, por nunca dejarme vencer frente a mis problemas, por ser fuerte y luchar por mis objetivos, el camino ha sido largo pero no imposible.

Resumen

La presente investigación se realizó en el Laboratorio del Central Azucarero Melanio Hernández Hernández, perteneciente a la Empresa Agroindustrial Azucarera del mismo nombre, ubicada en el poblado de Tuinicú, Municipio Taguasco, provincia Sancti Spíritus, Cuba y tuvo como objetivo comprobar la fermentación de los granos de kéfir de agua (GKA) en diferentes soluciones de miel final de caña de azúcar y su efecto sobre la cinética de crecimiento y la masa microbiana. El diseño incluyó un primer ensayo de prefermentación para activar los GKA, uno de repetibilidad y otro de reproducibilidad con tres concentraciones de miel final de caña de azúcar (5 %, 7 % y 9 %). Las variables analizadas fueron el pH y la biomasa microbiana en períodos de incubación de 72 h a temperatura ambiente. Como resultado se logra la activación y multiplicación del consorcio microbiano de los GKA en el laboratorio y se definen los pasos y condiciones del proceso de fermentación. Los GKA inoculados a las tres concentraciones de miel final de caña de azúcar como sustrato, evidenciaron una cinética de crecimiento (pH) y masa microbiana durante el proceso de fermentación similares, sin diferencias significativas entre ellas. Concluyéndose que la miel final de caña de azúcar constituye un sustrato viable y sostenible para la fermentación de los GKA y obtener una bebida con posibilidades de uso como aditivo probiótico en las condiciones de la empresa y Cuba; convirtiéndose en el primer trabajo investigativo que se realiza en el país en esta temática.

Palabras clave: Kéfir, Caña, Azúcar, Fermentación, Probiótico.

Abstract

This research was carried out in the Laboratory of the Melanio Hernández Hernández Sugar Mill, belonging to the Sugar Agroindustrial Company of the same name, located in the town of Tuinicú, Taguasco Municipality, Sancti Spíritus Province, Cuba, and its objective was to verify the fermentation of water kefir grains (WKG) in different solutions of final sugar cane molasses and its effect on growth kinetics and microbial mass. The design included a first preference test to activate the WKG, one of repeatability and another of reproducibility with three concentrations of final sugar cane molasses (5%, 7% and 9%). The variables analyzed were pH and microbial biomass in incubation periods of 72 h at room temperature. As a result, the activation and multiplication of the microbial consortium of the WKG in the laboratory is achieved and the steps and conditions of the fermentation process are defined. The WKG inoculated with the three concentrations of final sugar cane molasses as substrate, showed a similar growth kinetics (pH) and microbial mass during the fermentation process, with no significant differences between them. It was concluded that the final sugar cane molasses constitutes a viable and sustainable substrate for the fermentation of the WKG and to obtain a drink with possibilities of use as a probiotic additive under the conditions of the company and Cuba; becoming the first research work carried out in the country on this subject.

Keywords: Kefir, Cane, Sugar, Fermentation, Probiotic.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO I. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN	9
1.1. Introducción	9
1.2. Proceso de fermentación	10
1.2.1. Tipos de fermentación	10
1.2.1.1. Fermentación en estado sólido	11
1.2.1.2. Fermentación sumergida	12
1.2.1.2.1. Fases durante el crecimiento microbiano	13
1.3. Kéfir de agua	14
1.3.1. Origen y distribución del kéfir de agua	14
1.3.2. Diversidad microbiana	15
1.3.3. Usos del KA	16
1.3.4. Dinámica de fermentación e interacción microbiana	18
1.3.5. Fabricación de bebidas con kéfir de agua	20
1.3.5.1. Producción industrial.	20
1.3.5.2. Proceso de elaboración artesanal	21
1.3.6. Seguridad de las bebidas de kéfir de agua	22
1.3.7. Efectos beneficiosos del kéfir de agua (azucarado)	23
1.3.8. Sustratos para la fermentación del kéfir de agua	25
1.3.8.1. Azúcar blanco.	25
1.3.8.2. Azúcar morena (azúcar prieta).	25
1.3.8.3. Panela (raspadura).	26
1.3.8.4. Sustratos Saborizantes para fermentación	26
1.3.8.5. Sustratos alternativos	26
1.4. Residuales de la agroindustria	28
1.4.1. Residuales de la agroindustria azucarera	28
1.4.1.1. Proceso tecnológico de la caña de azúcar	28
1.4.1.2. Miel final de la caña de azúcar (melaza)	30
1.4.1.2.1. Miel final de caña de azúcar y su uso en la fabricación de dietas para ganado.	30
1.4.1.2.2. Propiedades físico-químicas de la miel final de caña de azúcar (melaza).	30
1.4.1.2.3. Melaza como medio de cultivo natural.	32
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS:	34
2.1. Caracterización de la unidad de estudio	34
2.2. Gránulos de Kéfir	34
2.3. Miel de caña de azúcar	34
2.4. Activación y producción del consorcio microbiano Kéfir de agua.	34
2.5. Ensayo de repetitividad.	35
2.5.1. Preparación del sustrato y fermentación.	35
2.6. Ensayo de reproducibilidad.	36
2.6.1 Preparación del sustrato y fermentación.	36
2.7. Análisis de la cinética de fermentación.	37
2.7.1. Análisis cuantitativos	37
2.7.2. Acidez activa.	38
2.7.3. Sólidos solubles/Brix	39
2.7.4. Pol	39
2.7.5. Pureza	40
2.8. Determinación de las biomásas húmedas de granos de kéfir de agua (peso drenado).	40
2.9. Análisis estadístico	40
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los consumidores son más conscientes del papel relevante de una dieta saludable con atributos nutricionales y funcionales para mejorar su bienestar (Jaime et al. 2022), y la incorporación de los probióticos en diferentes eslabones de las cadenas alimentarias puede tributar a ese alcance (Çevik et., 2019). En este sentido, las bebidas fermentadas tradicionales como el kéfir de leche y el kéfir de agua están ganando especial atención. El kéfir de agua, también conocido como 'aquakefir' o 'kéfir azucarado', es una bebida fermentada artesanal, ligeramente efervescente, de sabor ácido y afrutado y de baja graduación alcohólica que ocupa un espacio cada vez mayor por la alta aceptabilidad sensorial y su papel benéfico en la salud (Destro et al., 2019b).

Muchos estudios científicos han demostrado que el kéfir de agua tiene una amplia gama de propiedades funcionales, como propiedades probióticas (*Bifidobacterium aquikefir* g.), propiedades hidrocoloides, actividades emulsionantes y formadoras de espuma (Laureys & De Vuyst, 2014, 2017).

La producción de kéfir de agua está industrializada actualmente en algunos países de Europa, Asia y América del Norte, aunque la producción casera o a pequeña escala sigue siendo la alternativa más popular en todo el mundo (Bengoa et.; 2019). Los granos de kéfir de agua son pequeños (de 1 a 10 mm de diámetro), translúcidos, de estructura quebradiza (se rompen con la presión) y de color variable que va del blanco al amarillento según el sustrato que se añada al medio de cultivo y el tipo de azúcar usado. Constituyen un sistema microbiológico complejo donde las bacterias ácido lácticas (BAL) ($10^7 - 10^8$ UFC/g), las bacterias del ácido acético ($10^6 - 10^7$ UFC/g) y las levaduras ($10^6 - 10^7$ UFC/g) coexisten en asociación simbiótica, sumergidos e inmovilizados en una matriz de polisacáridos producidos por la bacteria (Lynch et al.; 2021).

La bebida de kéfir de agua fermentada contiene una variedad de minerales y vitaminas que son esenciales para las actividades metabólicas del cuerpo humano, aunque pueden estar influenciados por el sustrato utilizado (Destro et al., 2019b).

Algunos autores consideran el kéfir como un probiótico, debido a los beneficios que aporta su ingesta al consumidor. Sin embargo, el término probiótico se define como “microorganismos vivos que, al ser ingeridos, aportan beneficios a la salud del huésped”. Sin embargo, existe dificultad para determinar las cepas probióticas del kéfir, debido a que la composición microbiológica es susceptible a interferencias por el tiempo, la temperatura y el tipo de sustrato utilizado en la fermentación (Gao et al., 2015).

El kéfir de agua se produce agregando granos de kéfir a una solución de agua y azúcar, y también se pueden agregar vegetales como zanahorias, cebollas, tomates, hinojo, melón y fresas para obtener fuentes nutricionales sensoriales y diferentes (Cassanego et.al.; 2015; Corona et al., 2016). Debido a su capacidad para fermentar diferentes sustratos alimentarios, estudios han explorado las propiedades fermentativas del kéfir de agua, con interés en mejorar la elaboración de bebidas funcionales, con alto valor nutricional y funcional (Puerari et al., 2012), partiendo de sustratos más económicos (Rodrigues et al., 2016; Souza & Silva, 2017).

El azúcar moreno es uno de los sustratos principales para la fermentación del kéfir en combinación con piña, jabuticaba, calabaza y arroz (Destro et al., 2019b; Koh et al., 2018; López-Rojo et al.; 2017; Souza y Silva, 2017); también sacarosa en combinación con malta molida e higo con limón (Fels et al., 2018; Rodrigues et al., 2016); jugos de frutas aisladas como melón, fresa, manzana, uva, kiwi, membrillo, granada y tuna (Corona et al., 2016; Randazzo et al., 2016).

El kéfir de agua ha sido estudiado, principalmente por su impacto en el sistema inmunológico y la salud gastrointestinal, siendo beneficioso para prevenir enfermedades no transmisibles como la malabsorción de lactosa, diabetes, obesidad, inflamación y afecciones cardiovasculares a través de la modulación de la microbiota intestinal (Calatayud et al., 2021; da Silva Araújo et al., 2023; Dimidi et al., 2019; Fiorda et al., 2017).

Los productos fermentados han sido considerados durante mucho tiempo alimentos básicos en muchos países porque el proceso de fermentación es una técnica

antigua para producir, conservar o transformar las propiedades organolépticas de alimentos y bebidas (Bengoa et al., 2019; Fiorda et al., 2017; Villarreal-Morales et al., 2018). La mayoría de estas matrices son espontáneas o pueden fermentarse utilizando un cultivo iniciador (fermentos dependientes de cultivo), por lo que existen diversas variables en el proceso de su fermentación, incluida la fuente de los microorganismos, sus ingredientes nutricionales y las condiciones ambientales, lo que resulta en miles de diferentes variaciones de estos productos (Dimidi et al., 2019; Şafak et al., 2023., Sharma & Yaiphathoi, 2020; Villarreal-Morales et al., 2018) El ecosistema microbiano que constituye los granos y la bebida fermentada consumida puede variar según las condiciones de fermentación (tiempo y temperatura) y especialmente con el uso de diferentes sustratos (fuente de azúcares, aditivos como frutas y melazas). En este sentido, las poblaciones de microorganismos en la bebida así como los metabolitos que estos producen varían y en consecuencia sus propiedades para la salud. Por otra parte, también se discute el conocimiento de las variables que afectan el crecimiento del grano por su relevancia en el mantenimiento de la biomasa iniciadora (Pendón et al., 2022., Zannini et al., 2022); no obstante hay escasez de estudios que evalúen la influencia de diferentes azúcares comúnmente comercializados en la producción de bebidas de kéfir de agua (Tavares et al., 2023); este autor incluyó en su estudio la melaza, no obstante son pocos las referencias de evaluaciones con miel final de caña de azúcar. Sin embargo, puede lograrse buenos rendimiento de biomasa del kéfir de agua a partir de sustratos azucarados de bajo costo de la industria azucarera, pueden ser (piloncillo, panela, melaza, melado, mascabado, azúcar morena y azúcar blanca) (Díaz Garcés, et al., 1988).

Se observa que los diferentes enfoques sobre el kéfir de agua, no solo descifra la diversidad química y microbiana de este fermentado modificado y producido localmente de forma sostenible, sino que también permite su posible uso posterior como ingrediente terapéutico, como probióticos y postbióticos bajo el enfoque de una salud.

Situación problemática

1. Poco aprovechamiento de nuevas potencialidades de los residuales de la industria azucarera que puede aportar valor agregado a los mismos.
2. Limitados estudios en el país vinculados con la obtención de bebidas fermentadas a partir de los gránulos de kéfir de agua.
3. Insuficiente conocimiento sobre la cinética de crecimiento de los gránulos de kéfir de agua en diferentes concentraciones de miel final e caña de azúcar.

Problema científico: ¿Cómo influye las soluciones de miel final de caña de azúcar en la cinética de crecimiento y la masa microbiana del kéfir de agua durante el proceso fermentativo?

Objeto de estudio: El proceso de fermentación del kéfir de agua

Campo de acción: El proceso de fermentación del kéfir de agua en miel final de caña de azúcar.

Objetivo general: Comprobar la fermentación de los granos de kéfir de agua (GKA) en diferentes soluciones de miel final de caña de azúcar y su efecto sobre la cinética de crecimiento y la masa microbiana.

Objetivos específicos:

1. Compartir información de actualidad sobre el kéfir de agua, papel benéfico y sustratos utilizados en la fermentación.
2. Determinar la activación y producción del consorcio microbiano Kéfir de agua en el laboratorio y definir su proceso de fermentación.
3. Comprobar el efecto de diferentes concentraciones de miel final de caña de azúcar sobre la cinética de crecimiento y la masa microbiana de los GKA.
4. Recopilar información orientada a la factibilidad de producir una bebida fermentada con gránulos de kéfir de agua el empleo de miel final de caña de azúcar como sustrato.

Fundamentación

Esta investigación se justifica porque es comprobada la gran importancia que tienen los alimentos fermentados y en especial el kéfir de agua en la dieta humana y animal por su efecto sobre la salud. El sustrato que normalmente se utiliza para la fermentación de los gránulos de Kéfir de agua, es al azúcar, producto que en Cuba

tiene un nivel limitado de producción y sus destinos prioritarios están ya definidos. La búsqueda de sustratos más económicos y sostenibles como lo son los residuales de la industria azucarera puede dar lugar a la generación y desarrollo de nuevos productos y procesos con valor agregado.

Justificación

Las investigaciones desarrolladas en los últimos años han ratificado que los probióticos y prebióticos tienen efecto positivo en la salud humana y en la producción animal mediante diferentes mecanismos; destaca la interacción directa con la microbiota natural, establecimiento de reacciones enzimáticas e interactuando con la mucosa y las células epidérmicas del intestino.

En el proceso del cultivo de los microorganismos probióticos es necesario proveerlos de un sustrato que posea todos los nutrientes requeridos para su desarrollo, constituye un limitante para su extensión la selección de medios de cultivos adecuados y económicamente factibles, diferentes de los convencionales, por ello se sugiere buscar alternativas de medios naturales para su sustitución total o parcial, reconociéndose dentro de los candidatos los residuos agroindustriales (Hernández et.al 2016; Khare et.al., 2018).

El kéfir de agua como probiótico es una bebida fermentada artesanal elaborada a partir de granos de kéfir, ha ganado una inmensa popularidad en todo el mundo debido a sus potenciales propiedades promotoras de la salud. Las bebidas de kéfir se comercializan y se elaboran de forma privada por parte de particulares en varios países. La fermentación se produce a través de microorganismos multiespecie que están presentes naturalmente en los granos de kéfir (Choi et al., 2021).

Los gránulos de kéfir están en continuo crecimiento por ser microorganismos vivos; los nódulos que se crean, se parten por gemación y poco a poco duplican su tamaño necesiéndose más aporte energético y espacio. Para la elaboración a escala comercial se necesita de cultivos seleccionados y eficientes que permitan controlar la microflora involucrada para obtener producción de calidad y estandarizada; así como extender la vida útil del producto y facilitar los aspectos nutrimentales, donde

se incluyen altos valores de bacterias viables, además de buenas propiedades químicas y organolépticas.

No aparecen en las fuentes bibliográficas consultadas, muchas publicaciones que utilicen la melaza y miel final como sustrato en la fermentación de los GKA (Hidalgo Guerrero, 2023), por lo que para optimizar su uso, en las condiciones de Cuba, se requiere realizar múltiples investigaciones que permitan esclarecer aspectos relativos a concentraciones y condiciones de fermentación.

Resultados esperados

Como resultado de la investigación se espera el diseño de un proceso para la mantención de los gránulos de kéfir de agua en el laboratorio y su cinética de crecimiento. Se obtendrá, además, un producto fermentado de kéfir de agua crecidos en miel final con la calidad requerida.

Hipótesis: Las condiciones de fermentación y el sustrato pueden afectar la cinética de crecimiento y la masa microbiana del kéfir de agua.

Variable independiente.

1. Concentraciones de miel final de caña como sustrato para la fermentación de los GKA
2. Peso inicial de los gránulos de Kéfir de agua
3. pH inicial de los sustratos

Variables dependientes:

1. Peso Final de los GKA (g).
2. Incremento de peso de los GKA:
3. pH final
4. Disminución del pH.
5. *Sólidos solubles/Brix:*
6. Pol (Contenido de sacarosa)
7. Pureza

La descripción de cada una de las variables se observa en el anexo 1.1.

Aportes de la investigación

Aporte científico: Aportes al conocimiento que facilite el proceso de transferencia, adopción y generalización de procedimientos y protocolos técnicos relacionados con la fermentación de los gránulos de Kéfir de agua en un sustrato a base de miel final de caña.

Aporte social: Información fundamentada y actualizada para fortalecer la capacidad de transferencia de tecnología sostenible a nivel local y en un sector clave como la agroindustria azucarera que en períodos de no zafra mantienen infraestructuras y personal subutilizado. De igual forma existe la posibilidad de disponer de un alimento fermentado con diversas utilidades en humanos y animales.

Estructura asumida para elaborar el trabajo de diploma

El Trabajo de diploma está conformado por una introducción; dos capítulos, dónde el capítulo uno resume el marco teórico de partida desde el cual se fundamentará la investigación. En el capítulo dos se describen los materiales y métodos seguidos en los diferentes ensayos. En el tercer capítulo se refleja los resultados y discusión de las variables analizadas. Posteriormente se arribará a las conclusiones, se brindarán recomendaciones y se mostrará las referencias bibliográficas.

CAPITULO I. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Introducción

En este capítulo se hace un análisis de los diferentes conceptos y definiciones generales brindados por diversos autores, que contribuyen al desarrollo de la investigación, relacionados con el kéfir de agua y sustratos para su fermentación. Se persigue facilitar, mediante este análisis bibliográfico, el cumplimiento de los objetivos propuestos. En la Figura 1.1 se muestra el hilo conductor seguido para conformar el marco teórico referencial de la investigación.

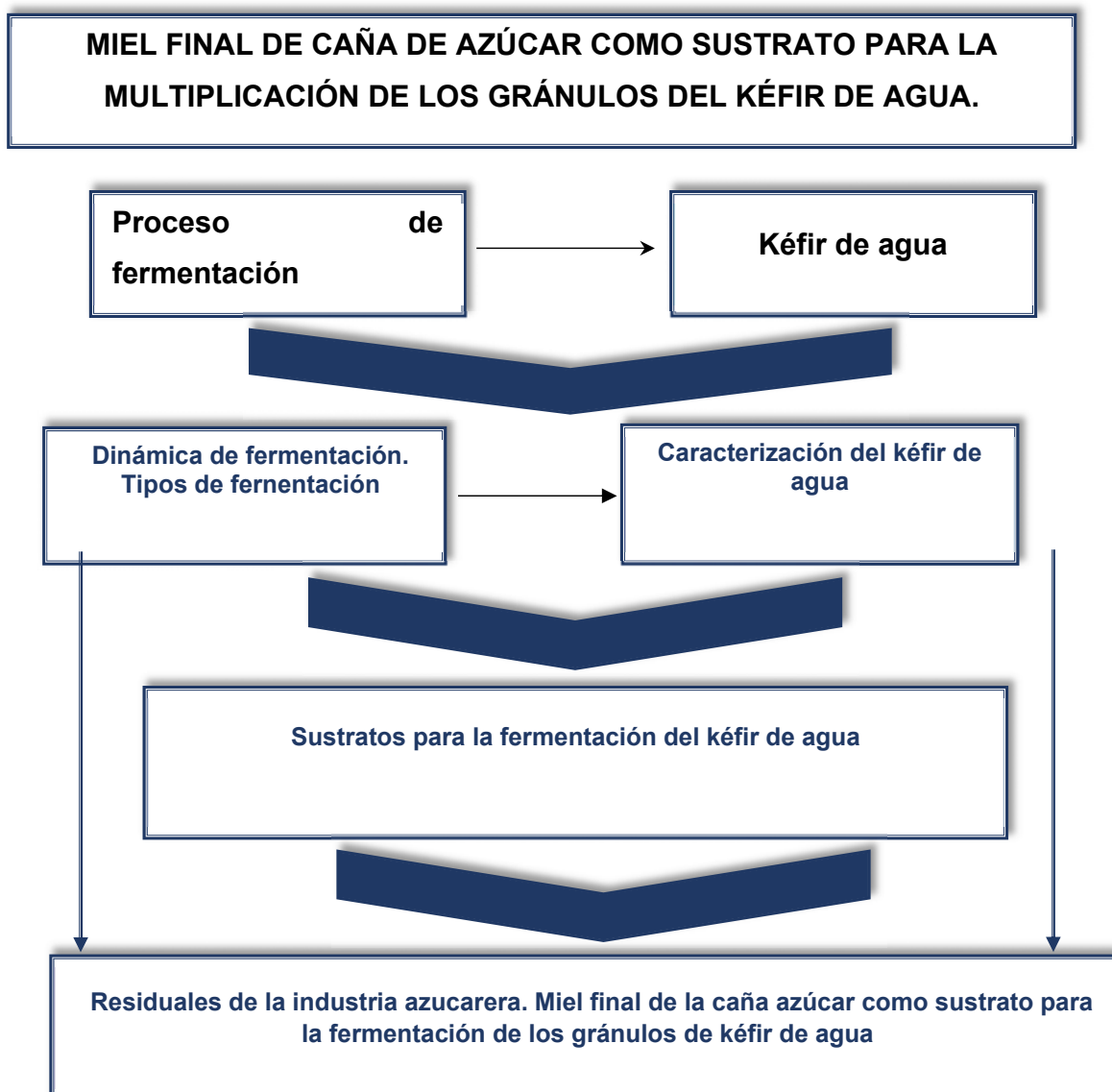


Figura 1.1. Hilo conductor para la elaboración del marco teórico y referencial de la esta investigación.

Fuente: “Elaboración Propia”.

1.2. Proceso de fermentación

La fermentación es un fenómeno natural anterior a nuestra comprensión completa de los procesos bioquímicos involucrados. Los antepasados aprovecharon este proceso natural para crear una variedad de productos como cerveza, vino, hidromiel (bebida a base de agua y miel fermentada) y queso. En las décadas de 1850 y 1860, Louis Pasteur fue el zímurgista pionero, que profundizó en el estudio de la fermentación y demostró que era causada por células vivas. Alrededor de 1837 y 1838, C. Cagniard de la Tour, T. Swann y F. Kuetzing publicaron trabajos que proporcionaban pruebas convincentes que respaldaban la naturaleza viva de la levadura (Supriya et al., 2023).

A través de sus investigaciones microscópicas independientes, confirmaron que la levadura era un organismo vivo capaz de reproducirse mediante gemación. Curiosamente, el término "levadura" tiene sus orígenes en una palabra sánscrita que significa "hervir", probablemente porque el pan y el vino, dos alimentos básicos de Europa, se producían con levadura. A medida que avanzaba la investigación, los científicos también descubrieron la presencia de bacterias en el proceso de fermentación (Supriya et al., 2023).

El objetivo principal de un proceso de fermentación es la bioconversión de sustratos en productos, mediante el uso de condiciones que proporcionen un entorno óptimo para los microorganismos y promuevan la viabilidad económica a gran escala (Gervasi & Mandalari, 2024).

1.2.1. Tipos de fermentación

Los procesos fermentativos se pueden clasificar según varios criterios, no obstante en general, se dividen en 2 tipos según el tipo de sustrato utilizado (estado físico del sustrato): fermentación en estado sólido (FES) y fermentación sumergida (FS o Líquida) (Gervasi & Mandalari, 2024; Supriya et al., 2023).

1.2.1.1. Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido es un proceso específico en el que los microorganismos prosperan en un sustrato sólido en condiciones controladas, generalmente en ausencia de agua libre. Con el tiempo, el avance de estas técnicas ha permitido la producción a gran escala de una amplia gama de compuestos bioactivos, incluidos antibióticos, pigmentos, antioxidantes, agentes antitumorales, biotensioactivos, péptidos bioactivos y más. Generalmente, la FES se utiliza para la producción de piensos secos fermentados, que pueden incorporarse a mezclas de piensos básicos como los cereales integrales. Alternativamente, el alimento seco fermentado se puede transformar en forma de polvo (Gervasi & Mandalari, 2024). La humedad esencial para el proceso se absorbe dentro de la matriz sólida, como lo describe. Sin embargo, es crucial que el sustrato mantenga suficiente humedad para facilitar el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos (Gaden, 1959).

Selección de microorganismos

La selección de microorganismos es un factor crucial para mejorar el rendimiento del producto. El enfoque FES, caracterizado por su bajo contenido de humedad, es aplicable a una gama restringida de microorganismos, principalmente hongos como *Rhizopus* spp. y *Aspergillus* spp. y algunas bacterias, como *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* spp. también empleado en este método (Haryati et al., 2015).

Sustrato

La elección del sustrato juega un papel importante en el crecimiento de microorganismos y, en consecuencia, aumenta el rendimiento del producto. Lo ideal es que el sustrato seleccionado proporcione tanto soporte físico como nutrientes esenciales para sustentar un cultivo próspero.

En el proceso FES, la selección del sustrato es crucial ya que sirve como soporte físico y fuente de nutrientes para el cultivo en crecimiento. Los residuos agrícolas comúnmente empleados como sustratos en FES incluyen bagazo de yuca y caña de azúcar, varios salvados de cereales como salvado de trigo, salvado de arroz y salvado de avena, así como salvado de soja (Farinas, 2015). Además, también se

utiliza pulpa de café y su cáscara, cáscaras y pulpas de frutas, virutas de madera, mazorcas de maíz y pajitas de diferentes procedencias. Estos materiales están compuestos principalmente de celulosas, hemicelulosas, lignina, almidón, pectinas y otras fibras.

Dependiendo de la composición del sustrato se debe seleccionar el microorganismo. Los residuos lignocelulósicos son los más adecuados para la actividad de los hongos que pudren la madera. Específicamente, los hongos de pudrición blanca, que pertenecen a los grupos Basidiomicetos y algunos Ascomicetos, son expertos en degradar la lignina. Por otro lado, los hongos de la pudrición parda (Basidiomicetos) destacan por degradar celulosas y hemicelulosas. Los hongos de pudrición blanda, representados por especies como *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*, poseen un sistema completo de celulasas que liberan en su entorno.

Los residuos agrícolas desempeñan un doble papel en el proceso, sirviendo no sólo como soporte sólido para el crecimiento de la biomasa y la absorción de nutrientes, sino también como una valiosa fuente de nutrientes y carbono para los organismos. En algunos casos, se hace necesaria una suplementación adicional para garantizar un crecimiento óptimo. El medio suele estar enriquecido con macro y micronutrientes, incluidos elementos como P, S, K, Mg, Ca, Zn, Mn, Cu, Fe, Co y yodo (Farinas, 2015). A la hora de seleccionar el sustrato, la disponibilidad y el coste son los principales factores a tener en cuenta.

1.2.1.2. Fermentación sumergida

La fermentación sumergida es una técnica de cultivo que involucra microorganismos cultivados en un caldo o sustrato líquido que fluyen libremente, en presencia de grandes cantidades de agua libre. Este proceso descompone los nutrientes y libera los compuestos bioactivos deseados en la solución. En este enfoque, el sustrato de fermentación permanece en forma líquida, ofreciendo nutrientes esenciales para la proliferación microbiana. Utiliza sustratos líquidos de flujo libre, como melaza, caldos, azúcares solubles, jugos de frutas y verduras, suero, medios líquidos, granos de destilería húmedos y aguas residuales (Missotten et al., 2015).

En este enfoque, se cultivan microorganismos específicos dentro de recipientes cerrados llenos de un caldo rico en nutrientes y una alta concentración de oxígeno. En la fermentación sumergida (FS), el sustrato se consume rápidamente, lo que requiere un reemplazo constante o una suplementación con nutrientes. El fermentador, que alberga el sustrato, funciona de forma continua y la biomasa del producto se cosecha continuamente utilizando diversos métodos técnicos y finalmente el producto se filtra o centrifuga y luego se seca (Sabate et al., 2012).

Las bacterias más adecuadas para la fermentación sumergida son aquellas que prosperan en condiciones con alto contenido de humedad o alta actividad de agua. La fermentación sumergida (FS) se emplea para producir alimento líquido fermentado utilizando estas bacterias secas. Esto convierte a SmF en la técnica más popular, utilizada para producir muchos productos y la opción predominante para operaciones industriales (Gervasi & Mandalari, 2024).

Ventajas de la fermentación sumergida (Supriya et al., 2023)

- ♣ Monitoreo mejorado de la temperatura, oxígeno disuelto, pH y concentración de moléculas solubles en agua.

La separación de la biomasa tras el proceso de fermentación fue sencilla

Mezcla suave y aireación.

Proceso de ampliación sencillo

1.2.1.2.1. Fases durante el crecimiento microbiano (Supriya et al., 2023).

A) Fase de retraso

Después de la inoculación, hay un período inicial sin un aumento significativo en el número de células microbianas, y esta fase se conoce como "fase de retraso".

Durante esta etapa, los organismos se aclimatan al nuevo entorno en el que son introducidos.

B) Fase de aceleración

La fase de aceleración se refiere al período en el que las células apenas han comenzado a multiplicarse y su número comienza a aumentar.

C) Fase de registro

La fase logarítmica, también conocida como fase exponencial, se caracteriza por un aumento rápido y constante del número de células.

D) Fase de desaceleración

La fase de desaceleración es el período en el que la tasa de crecimiento previamente constante comienza a disminuir.

E) Fase estacionaria

Durante la etapa estacionaria, la población de células microbianas alcanza un estado de equilibrio sin que se produzca un crecimiento significativo. Esta etapa se alcanza cuando se agota la fuente de carbono o cuando hay una acumulación de productos finales.

F) Fase de muerte

En la fase de muerte, el número de células disminuye constantemente como resultado de la reducción de la actividad metabólica y el agotamiento de los recursos energéticos, lo que conduce a la muerte celular.

La elección de mantener fases específicas de crecimiento celular depende del producto deseado. En la producción microbiana en masa, comúnmente se prefiere la fase logarítmica (log).

Los procesos fermentativos se pueden clasificar en fermentaciones por lotes, donde el sustrato y el microorganismo productor se agregan al sistema al inicio y no se eliminan hasta que se completa el proceso. Las fermentaciones continuas y discontinuas involucran microorganismos que pueden inmovilizarse y reutilizarse durante varios ciclos, lo que conduce a una mayor eficiencia.

1.3. Kéfir de agua

1.3.1. Origen y distribución del kéfir de agua

El kéfir de agua es una bebida fermentada artesanal, ligeramente espumosa, afrutada y carbonatada, con alto contenido en ácido láctico (hasta 2%) y bajo contenido alcohólico (normalmente inferior al 1%), tradicionalmente producida por fermentación de una solución de sacarosa a la que se le añaden frutas frescas o secas y los denominados granos de kéfir de agua (Güzel-Seydim, et al., 2023., Moretti et al., 2022).

Los gránulos de kéfir de agua, también conocidos como gránulos de kéfir azucarado o “*sugary kefir*”, tienen un origen incierto y han sido denominados con diferentes nombres a lo largo de la historia. Algunos de estos nombres incluyen “*Tibicos*”, “*Tibi*”, “*Ginger beer plants*” (plantas de cerveza de jengibre) y “*Japanese Beer Seeds*” (semillas de cerveza japonesa), debido a las diferentes hipótesis sobre su origen (Pendón et al., 2022).

Una de las hipótesis sugiere que los gránulos fueron introducidos en Europa por soldados británicos que regresaron de la Guerra de Crimea en 1855, y los llamaron *Ginger beer plants* (plantas de cerveza de jengibre). Por otro lado, una segunda hipótesis propone que estos gránulos, conocidos como “*Tibis*”, se formaron de manera espontánea a partir de las hojas del cactus mexicano *Opuntia*, donde los microorganismos se alimentaban de las excreciones azucaradas de la planta. A pesar de la incertidumbre sobre su origen, los gránulos se transmiten de generación en generación para la elaboración casera de esta bebida fermentada en todo el mundo (Cufaoglu & Erdinc, 2023., Fiorda et al., 2017).

El consumo de kéfir de agua, como el de muchas otras bebidas fermentadas, ha aumentado en los últimos años respaldado por numerosos estudios científicos, los cuales documentan que esta bebida es una fuente de microorganismos probióticos y metabolitos con beneficios potenciales para la salud (Lynch et al., 2021), así como también posee dentro de sus ventajas el que es apto para consumidores veganos y/o intolerantes a la lactosa (Güzel-Seydim et al., 2023).

Entre los países con mayor consumo de kéfir de agua se encuentran Estados Unidos, México y Canadá, en América del Norte; Francia, Grecia, Turquía, Rumania, Rusia, Reino Unido, Bélgica, Países Bajos, Noruega, Suecia, España y Portugal en Europa; y Brasil, Chile, Perú y Argentina en América Latina (Fiorda et al., 2017).

1.3.2. Diversidad microbiana

A través de los años se han realizado diversos estudios por medio de métodos cultivo-dependientes y métodos moleculares para determinar las especies y proporciones de microorganismos que se encuentran presentes en los tibios de diversas regiones geográficas. Sin embargo, los resultados obtenidos varían según

la zona geográfica de dónde procedan. Además estas macro colonias son capaces de modificar la proporción de bacterias y levaduras, así como las especies según el tiempo de fermentación, condiciones experimentales, temperatura, y los microorganismos circundantes (Gamba et al., 2019).

En términos generales la microbiota del kéfir está constituida principalmente por bacterias ácido-lácticas, homofermentativas y heterofermentativas, las cuales están presentes en la mayor proporción, seguidas por levaduras y finalmente por algunas bacterias ácido-acéticas, conformando una asociación simbiótica muy estable. En general, la microbiota del kéfir de agua está compuesta por una estructura de polisacárido dextrinado insoluble en agua, en donde viven en simbiosis bacterias ácido lácticas, bacteria ácido acéticas y levaduras. El polisacárido es un polímero de glucosa (da Anunciação et al., 2024).

1.3.3. Usos del KA

Dentro del mercado saludable en auge se encuentra el interés hacia los productos “libres de” lactosa y colesterol, basado en un cambio de hábito que limita el consumo de productos de origen animal. En una revisión, (De Bellis et al., 2021) informan que “...las matrices a base de plantas son sustratos aptos para albergar y distribuir poblaciones microbianas debido a su riqueza en nutrientes, fibras, vitaminas, minerales y fitoquímicos bioactivos dietéticos. Los datos disponibles indican que las propiedades intrínsecas de promoción de la salud de diversas matrices de origen vegetal pueden explotarse y mejorarse con éxito desarrollando una asociación eficaz con probióticos, cuya actividad beneficiosa podría a su vez mejorarse y modularse mediante componentes del vehículo de origen vegetal.”. A su vez, la preferencia por los productos probióticos de origen vegetal se puede deber también al creciente interés en una dieta basada en plantas, impulsado por motivaciones medioambientales.

Los granos de kéfir tanto de leche como de agua son partículas gelatinosas que contienen microorganismos probióticos. Si bien, los dos tipos de bebidas fermentadas se obtienen a partir de estos granos, éstas tienen características físicas

y químicas diferentes y una composición microbiológica distinta; mientras que el kéfir de leche se ha estudiado.

Además de las tendencias de mercado orientadas a productos percibidos como saludables durante la pandemia de COVID 19 se exploraron agentes antivirales no convencionales para reducir el riesgo de infección y promover una recuperación rápida de esta enfermedad. Debido al potencial de actividad antiviral, los alimentos fermentados y sus bacterias probióticas recibieron especial interés. Varias cepas de probióticos demostraron una amplia gama de actividades antivirales y diferentes mecanismos de acción, debido a la estimulación de la función del sistema inmunitario y a la producción de componentes bioactivos (Moretti et al., 2022). Al kéfir de agua se le atribuyen propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y hepatoprotectoras y se considera puede ayudar a mejorar la salud intestinal y la respuesta inmune (Güzel-Seydim et al., 2023).

El desarrollo de polímeros de base biológica está ganando cada vez más importancia en materia de investigación y desarrollo industrial, potenciado por preocupaciones medioambientales (incremento de desechos plásticos, calentamiento global, reducción en la disponibilidad de recursos fósiles; en particular, existe un interés creciente en el desarrollo de membranas renovables y biodegradables (Linares-Bravo et al., 2022)

En el campo industrial, la mayoría de películas de base biológica son aquellas que proceden de plantas (almidón, pectina), algas (alginato, carragenina), proteínas animales (gelatina, caseína) y algunos polisacáridos microbianos (xantana) (Linares-Bravo et al., 2022; Moretti et al., 2022). La búsqueda de alternativas poliméricas y/o diferentes estrategias de formulación de películas gana cada vez más protagonismo. Dentro de esta clase de biopolímeros, los exopolisacáridos (EPSs), como el dextrano presente en el kéfir de agua, han recibido especial atención. Éstos son producidos por una variedad de bacterias, las cuales los secretan en forma de cápsulas o como una delgada capa alrededor de la célula bacteriana. Particularmente, en la producción de kéfir de agua, a medida que se producen los ciclos de fermentación, la cantidad de biomasa aumenta y la que no

se utiliza como inóculo para la siguiente fermentación, puede emplearse como fuente de extracción de dextrano e incorporarla en matrices a base de biopolímeros para el desarrollo sostenible de películas (Marinho et al., 2023).

1.3.4. Dinámica de fermentación e interacción microbiana

La composición del kéfir de agua y sus características sensoriales dependen de diferentes factores del proceso de fermentación como el inóculo (origen de los granos), la concentración y tipo de azúcar, composición del medio, capacidad buffer, concentración de calcio, incorporación de oxígeno, tiempo y temperatura de fermentación, el tipo de fruta añadida, entre otros (Lynch et al., 2021; Pendón et al., 2022).

Durante la fermentación, hay procesos que suceden simultáneamente como el crecimiento de los granos de kéfir y la síntesis de glucano. Durante las primeras 24 h de fermentación, la concentración de sacarosa disminuye en un 98%, mientras que la concentración de etanol se incrementa, y sucesivamente, la de ácido láctico, glicerol, acetato y manitol; este consumo inicial de sacarosa está positivamente correlacionado con la producción de etanol por las levaduras (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*). Las levaduras también poseen una invertasa que hidroliza la sacarosa, incrementando la concentración de fructosa y glucosa, que son metabolizadas por las bacterias ácido láctico y ácido acético. En etapas avanzadas del proceso, los niveles de etanol disminuyen debido a su conversión en acetato por las bacterias ácido acéticas (Pendón et al., 2022). En la tabla 1.1 se destacan algunas condiciones generales de fermentación reportadas en la bibliografía.

Tabla 1.1. Condiciones de fermentación del kéfir de agua

Biomasa (% p/v)	Sustrato (% p/v)	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo (h)	Referencia
6-20	Azúcar (6-30)	21	24-48	(Pendón et al., 2022)
6 a 30	Sacarosa (6,10)	20-25	24-72	(Moretti et al., 2022 kefir)
10	Azúcar refinada, azúcar morena, azúcar de coco, azúcar demerara, melaza de caña (10)	27	48	(Tavares et al., 2023)
20	Azúcar (4)	21	17,21,25,29	(Laureys, Leroy, Vandamme, & De Vuyst, 2022)

El kéfir de agua al comienzo de la fermentación es un entorno desafiante para los microorganismos, ya que tiene niveles altos de carbono (sacarosa) pero los niveles de nitrógeno disponible son bajos. El nitrógeno es esencial para el crecimiento de los microorganismos y se encuentra inmovilizado en las frutas. Es necesario que las levaduras secreten al medio aminoácidos y péptidos, que extraen de las frutas, para que estén disponibles para las bacterias (Lynch et al., 2021). Además, las levaduras hidrolizan la sacarosa produciendo glucosa y fructosa. Estos azúcares son utilizados para realizar la fermentación alcohólica dando lugar a etanol y dióxido de carbono, lo que contribuye a ese toque gaseoso característico del kéfir (Lynch et al., 2021). La hidrólisis de la sacarosa, hace que la fructosa y la glucosa estén disponibles para las bacterias. Las BAL también son capaces de hidrolizar la sacarosa dando lugar a glucosa y fructosa, que vía fermentación láctica genera ácido láctico, lo que reduce el pH de la bebida y ayuda a inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados; además la **sacarosa es el sustrato principal para la síntesis del dextrano un exopolisacárido** producido por las BAL, y el componente principal de la matriz de los nódulos (Ozcelik et al., 2021). Durante la

fermentación hay BAL que pasan a la solución donde crecen y fermentan azúcares y otras que se quedan unidas a los nódulos donde se encargan de sintetizar la matriz que los conforma (Pendón et al., 2022). Por último, las bacterias ácido acéticas (BAA) contribuyen a mantener el pH bajo metabolizando etanol y en menor medida glucosa, produciendo ácido acético y ácido glucónico respectivamente (Martínez-Torres et al., 2017).

1.3.5. Fabricación de bebidas con kéfir de agua

1.3.5.1. Producción industrial. La metodología general para la producción de kéfir de agua se ilustra en la Figura 1.1. Primero se prepara un medio de sacarosa con o sin frutas secas o extractos de frutas; se añaden los granos de kéfir y se incuban a 21°C por 2-3 días. Después de la fermentación, los granos se separan del medio por filtración, se lavan, se secan y se mantienen en un tanque de refrigeración hasta la próxima inoculación; esencialmente pueden reutilizarse *ad infinitum*. Es importante mencionar que el uso de cultivos iniciadores definidos no es común en la elaboración de kéfir de agua de forma artesanal. Dado que la regulación del proceso de producción de kéfir es incipiente, también es necesario definir muchos parámetros de calidad para el escalado de este producto (Laureys et al., 2022; Moretti et al., 2022 kefir).

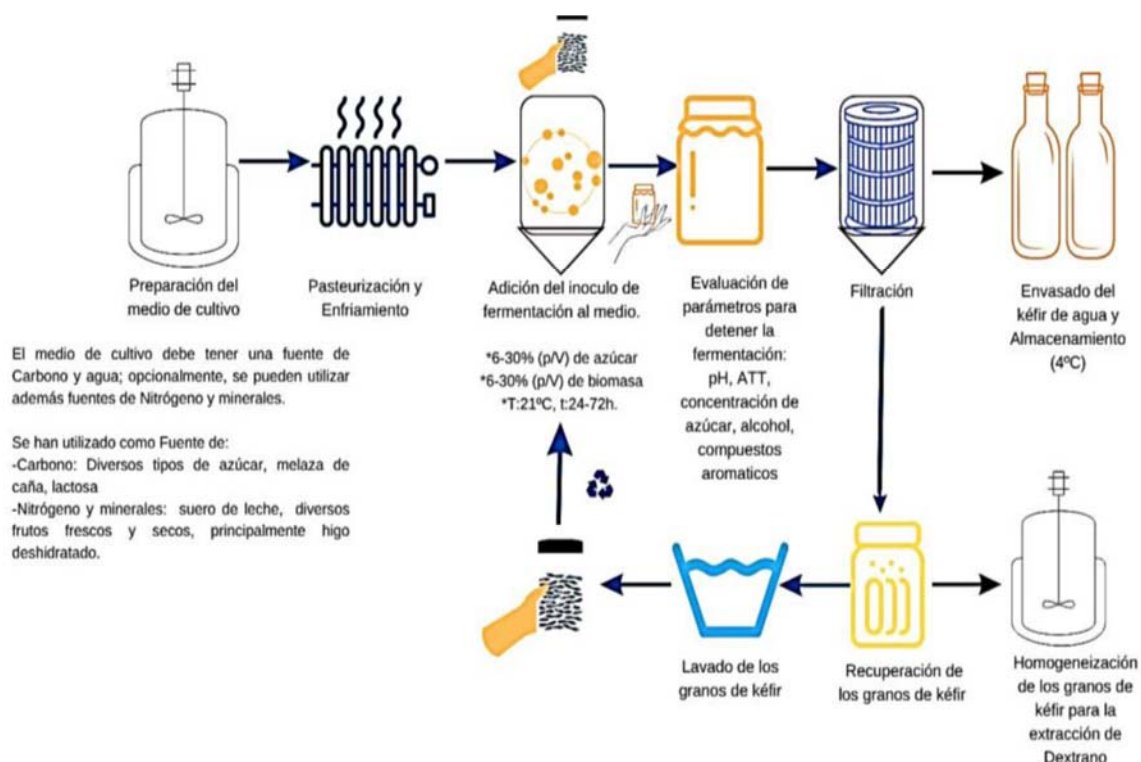


Figura 1.1. Diagrama de proceso general de producción del kéfir de agua a pequeña escala industrial. Elaborado a partir de información de: Guzel-Seydim et al., (2021), Laureys et al., (2022) y Zannini et al., (2023).

1.3.5.2. Proceso de elaboración artesanal

En este proceso, los gránulos de kefir de agua se agregan directamente a la solución azucarada preparada con agua potable o mineral y se incuban a temperatura ambiente. Una vez finalizada la fermentación, los gránulos se separan del medio por filtración a través de un tamiz o colador, se lavan, se secan suavemente y se mantienen en un tanque de enfriamiento para la siguiente inoculación. Una vez filtrada la bebida fermentada, se almacena a 4°C y ya está lista para su consumo y/o distribución. Luego de envasado el kefir, la fermentación continúa aunque más lentamente debido a los microorganismos presentes. La vida útil del producto envasado aún no se ha definido, aunque podría relacionarse con la viabilidad de los microorganismos y con las características organolépticas del

producto fermentado, las cuales van cambiando a lo largo de la fermentación (Cadena, 2022; Monar et al., 2014).

Existe una interrelación entre la composición del medio, las condiciones de fermentación, la composición microbiana, la cinética y los productos de fermentación del kéfir de agua resultante. Por lo tanto, las características de cada proceso de fermentación dependen de la selección específica de los sustratos utilizados (Şafak et al., 2023., Zannini et al., 2022).

1.3.6. Seguridad de las bebidas de kéfir de agua

Debido a que el pH del kéfir de agua suele estar por debajo de 4,5, incluso al inicio de la fermentación, y generalmente disminuye aún más después, va acompañado de la producción de ácido láctico y ácido acético (Laureys et al., 2018, 2019), el riesgo de crecimiento de microorganismos indeseables es bajo; sin embargo, este es el caso cuando se utilizan higos secos; Es posible que el uso de otras frutas no proporcione un pH tan bajo y, por lo tanto, protección (Randazzo et al., 2016). Sin embargo, el agua del grifo normalmente se hierve durante la preparación del kéfir de agua. Los sustratos agregados, por ejemplo, frutas, pueden contribuir con microorganismos indeseables (por ejemplo, Enterobacteriaceae y/o *Pseudomonas*); sin embargo, el riesgo puede reducirse si las frutas se pelan, se lavan y/o se agrega agua para la preparación del kéfir mientras aún está cerca de hervir. Alternativamente, la preparación de extractos de frutas permite un procesamiento más fácil del material del sustrato, haciéndolo susceptible de pasteurización, lo que se ha demostrado que reduce los niveles de contaminantes microbianos (Randazzo et al., 2016). Además, con la excepción de algunas especies de *Enterobacter*, no se han aislado ni reportado microorganismos patógenos en los granos de kéfir de agua (Gupta et al., 2024).

Si bien el contenido de etanol que puede oscilar entre 0,02 y 2,0% (Martínez-Torres et al., 2017) podría ser otro obstáculo contra microorganismos indeseables, generalmente se produce tarde en la fermentación; Además, en las bebidas que normalmente se comercializan por sus beneficios para la salud, los niveles significativos de alcohol no son deseables, especialmente si están etiquetados

como sin alcohol. En muchos países, el umbral por debajo del cual debe estar el contenido de etanol para ser etiquetado como no alcohólico es 0,5 %, pero esto puede variar según el país (Bellut et al., 2019). Sin embargo, al igual que con otros tipos de bebidas fermentadas, si el producto no está pasteurizado y contiene microorganismos vivos, existe el riesgo de que la fermentación continúe en la botella y pueda dar lugar a una formación continua de etanol durante el almacenamiento. Este es un problema potencial real cuando se venden productos vivos no pasteurizados, especialmente porque muchos productores y mayoristas secundarios no emplean la cadena de frío; por otro lado, muchos productores de kéfir optan por vender productos con cultivos vivos (no pasteurizados) en las botellas, ya que esto puede ser un factor positivo para los consumidores debido a los supuestos beneficios para la salud (Gupta et al., 2024).

1.3.7. Efectos beneficiosos del kéfir de agua (azucarado)

Los beneficios para la salud debido a la ingesta de kéfir de agua se sustentan empíricamente en siglos de consumo por parte de los humanos. Se ha encontrado amplia evidencia científica y, recientemente, se publicaron investigaciones muy completas, que incluyen el estudio de la actividad biológica de esta bebida (Egea et al., 2022., Gamba et al., 2019). En adición a esta actividad antimicrobiana, al kéfir de agua se le han asignado características inmunomodulantes, antihipertensivas, antitumorales, anticancerígenas, hepatoprotectivas, antitoxigénicas, hipocolesterómicas, hiperglicémicas, antihiperlipídicas, antioxidantes, antiinflamatorias y antiulcerogénicas. Asimismo, puede ayudar a mejorar la salud intestinal y la inmunidad (Bueno et al., 2021., Güzel-Seydim et al., 2023., Koh et al., 2024., Moretti et al., 2022).

A su vez se ha encontrado que posee actividad antimicrobiana comprobada frente a diversas especies de microorganismos patógenos, como *Streptococcus pyogenes*, *S. salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Moretti et al., 2022).

También, se describe que el producto de la fermentación con agua azucarada produjo inhibición de *C. albicans*, *S. typhi*, *Shigella sonnei*, *S. aureus*, y *E. coli*, en algunos casos con un efecto mayor al obtenido con los productos antimicrobianos comúnmente utilizados; distintos autores relacionan la capacidad antimicrobiana con la presencia de ácidos orgánicos débiles como los ácidos acético y láctico (Caro Vélez y León Peláez, 2015 Pamela., Fiorda et al., 2017).

Entonces, estos beneficios para la salud podrían atribuirse a los microorganismos presentes o a sus metabolitos (ácidos orgánicos y oligosacáridos, entre otros), así como también al efecto sinérgico debido a la presencia simultánea de ambos. Además, estos constituyentes podrían ser los causantes de la actividad biológica, generada por acción directa o indirecta, a través de la estimulación de la microbiota intestinal (Fiorda et al., 2017).

Estos efectos podrían atribuirse tanto a los microorganismos benéficos que se encuentran en la bebida fermentada como a sus metabolitos (ácidos orgánicos y oligosacáridos), de forma directa, o indirecta, a través de la estimulación de la microbiota intestinal. Sin embargo, aún se necesitan más investigaciones para comprender los múltiples beneficios a la salud asociados al consumo de kéfir de agua (Moretti et al., 2022 kefir), ya que las diferencias en el método de producción y factores tales como el origen del inóculo, los sustratos utilizados, la temperatura de fermentación y el tiempo influyen en el tipo y concentración de agentes bioactivos generados (Lynch et al., 2021). Es importante mencionar que a menudo se consume el kéfir como una bebida artesanal o de fabricación casera, por lo que ni el proceso de fermentación, ni la identidad de las cepas probióticas empleadas en su fabricación están regulados; por tanto, es necesario incorporarla a la legislación alimentaria de los países donde se consume (Moretti et al., 2022 kefir). Hasta 2021 ninguna cepa bacteriana había recibido aprobación para ser considerada como probiótico en la Unión Europea (Lynch et al., 2021).

En el Cáucaso, donde el kéfir se ha consumido a lo largo de los años, las personas viven hasta 110 y 125 años y se mantiene en buena salud, no conocen la tuberculosis, el cáncer o las enfermedades de los ojos.

1.3.8. Sustratos para la fermentación del kéfir de agua

El kéfir de agua se desarrolla en sustratos de sacarosa puede ser azúcar blanca, azúcar morena, panela o piloncillo, miel de abeja, caña de azúcar entre otros sustratos que aporten una fuente de sacarosa para que los microorganismos de la matriz puedan degradarla y formar ácido láctico, ácido acético y alcohol entre otros compuestos (Tavares et al., 2023).

1.3.8.1. Azúcar blanco.

En términos más comunes llamamos azúcar blanca a la sacarosa que es un disacárido formado por una molécula de fructosa y una de glucosa que se obtiene principalmente de la caña azucarera, para obtener el azúcar blanco es sometido a un proceso final de centrifugación hasta 1000rpm. Desde el punto de vista nutricional el azúcar blanco contiene calorías sin ningún tipo de nutriente es por ello que la OMS recomienda el consumo moderado de este sustrato endulzante, señalándose dentro de su composición (valor nutricional por 100g): Calorías (400), Carbohidratos - Sacarosa, Fructosa y Glucosa- (99.6%), Minerales: Hierro 0,6 mg, Magnesio 0,5 mg (Duran 2018, citado por (Barillas-Figueroa, 2021).

1.3.8.2. Azúcar morena (azúcar prieta).

Azúcar de caña no centrifugada (NCS, en inglés), es la denominación técnica utilizado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Naciones (FAO), es un producto sólido sin refinar que se obtiene por evaporación del jugo de caña de azúcar (FAO, 1994). Se ha consumido tradicionalmente como un edulcorante en la mayoría de las regiones productoras de caña de azúcar del mundo donde se le conoce con muchos nombres diferentes, siendo los más comunes azúcar moreno y gur (sur de Asia), panela (América Latina), moscovado (Filipinas), rapadura y azúcar mascavo (Brasil) y kokuto (Japón), (Jaffé, 2015). Señalándose dentro de su composición (valor nutricional por 100g): Calorías (376), Carbohidratos - Sacarosa, Fructosa y Glucosa- (96%), Minerales: Potasio (60 mg), Calcio (75 mg), Hierro (70 mg), Magnesio (60 mg), Manganeso (0,3 mg), Zinc (0,2 mg) y Vitaminas (0,32 mg) (Ayustaningwarno et al., 2023).

1.3.8.3. Panela (raspadura).

La panela es la misma variante de los azúcares blanco y moreno y debido a la purificación esta es mucho menor pues conserva la coloración marrón mucho más notoria y el sabor acaramelado propio de la caña de azúcar, aunque la función endulzante del azúcar refinado y la panela es el mismo, la diferencia está presente en la presencia de algunas vitaminas y minerales, pues al no ser refinado contiene estos componentes en mayor cuantía (Santos et al., 2024): (valor nutricional por 100g): Calorías (312), Carbohidratos – Sacarosa (83%), Fructosa (6%) y Glucosa (6%), Minerales (mg): Potasio (60 mg), Calcio (80 mg), Hierro (80 mg), Magnesio (95 mg), Manganeso (0,5 mg), Zinc (0,6 mg) y Vitaminas (0,32 mg).

1.3.8.4. Sustratos Saborizantes para fermentación

En la elaboración del kéfir de agua se añaden algún tipo de saborizantes para mejorar el sabor y el color del mismo, además agregar sustratos saborizantes le da ese toque frutal a la bebida, para ello se pueden usar o añadir distintos saborizantes de frutos secos como higos, uvas, también Té negro, Limón, Naranja, entre otros (Ledesma, 2022).

1.3.8.5. Sustratos alternativos

Se ha utilizado una gran variedad de sustratos para preparar kefir de agua. Los gránulos son agregados a soluciones azucaradas que se elaboran empleando azúcares no refinados como las melazas del jugo de caña de azúcar o el azúcar rubio (mascabado o “mascabo”) como sustrato. Generalmente, también se adicionan higos o rodajas de limón (Laureys & De Vuyst, 2014).

Se emplean sustratos alternativos con el fin de lograr bebidas funcionales con diferentes características sensoriales, debidas a los diversos compuestos metabólicos formados (Fiorda et al., 2017). Se ha descrito la adición de frutas y verduras como zanahoria, hinojo, melón, cebolla, tomate y frutilla (Corona et al., 2016), en donde se evaluó la permanencia de las propiedades beneficiosas para la salud, provenientes tanto del vegetal como del kéfir, y se estudió la aceptación por parte de consumidores potenciales, quienes prefirieron las bebidas de zanahoria y tomate por sobre las demás. Koh et al. 2018, emplearon calabaza como sustrato

para fermentar kéfir, logrando una buena aceptabilidad general y una alta viabilidad de los microorganismos característicos de la bebida.

En los últimos años, se realizaron diversos trabajos empleando otros sustratos, tales como extracto de coco e inulina (Alves et al., 2021), donde se hallaron un mayor crecimiento de los gránulos de kéfir cuando las concentraciones de inulina fueron mayores; suero de soja (Azi et al., 2021), donde determinaron que los gránulos de kéfir de agua son un iniciador viable para transformar el suero de soja en una bebida bioactiva; fruta de olivo ruso (Darvishzadeh et al., 2021), con el fin de lograr una bebida con alta actividad antioxidante; manzana (Velázquez-Quiñones et al., 2021), donde emplearon gránulos de kéfir de agua para elaborar una bebida tradicional (Tepache); pitayo roja (Bueno et al., 2021), en el que evaluaron su inactividad y características sensoriales; cereza cornalina, espino, granada, ciruela roja y rosada (Ozcelik et al., 2021), de las cuales granada y ciruela rosada fueron más aceptadas por los panelistas; y de remolacha (Paredes et al., 2022), donde se analizaron sus características fisicoquímicas. Esta diversidad de sustratos explorados demuestra el interés en la búsqueda de alternativas para la elaboración de bebidas fermentadas innovadoras y también económicas.

La utilización de sustratos alternativos para un posible usos como aditivo zootécnico es más limitado, no obstante se evaluó el efecto del kéfir como probiótico en el rendimiento de cabritos durante los períodos previo (45 días) y posterior al destete (45 días), utilizando como sustrato a leche (Atapoğlu et al., 2010). En evaluación del efecto de un producto fermentado de kéfir de agua (tínicos) en sustrato de miel de abeja como acidificante suministrado en el agua de bebida de pollos de engorde, durante todas las etapas (42 días) para mejorar los parámetros productivos (Gabriela Galarza-Heredia et al., 2023).

Otras investigaciones evaluaron los efectos de la ingesta de kéfir sobre el crecimiento y algunos perfiles bioquímicos en conejos domésticos utilizando como sustrato la leche (Tarek, Zabut, & Al-Krenawie, 2017), sobre la reducción de vibrios presentes en el cultivo de *Penaeus vannamei* a partir de la fermentación del jugo de caña (Troya et al., 2021) y a escala de granja se evaluó la palatabilidad y posibles

efectos secundarios en lechones destetados de diferentes pesos (Gangnat & Kreuzer, 2021), usando para el fermentado azúcar blanca y melaza de remolacha azucarera.

1.4. Residuales de la agroindustria

Los subproductos industriales derivados de la agricultura, la silvicultura y la pesca suponen el 1,4% de la producción total de residuos en la Unión Europea (Bedoić et al., 2019).

Los residuos, coproductos y subproductos agrícolas juegan un papel relevante en la producción de alimentos para animales a nivel mundial, mientras que los residuos de biomasa se utilizan ampliamente en la producción de bioenergía. Sin embargo, una bioeconomía sostenible debe priorizar la producción de alimentos de alta calidad (Capanoglu et al., 2022; Valenti, Porto, Selvaggi, & Pecorino, 2020). Los volúmenes que se generan de estos residuos depende en gran medida de factores bióticos y abióticos. Se ha informado que los países de Europa occidental muestran un alto potencial para el uso de subproductos de las actividades de cultivo de hortalizas. Por el contrario, en Europa Central y del Este se obtienen grandes volúmenes de subproductos de cereales y la valorización de los subproductos podría ser de gran interés debido a sus superficies terrestres y condiciones climáticas suaves (Bedoić et al., 2019).

1.4.1. Residuales de la agroindustria azucarera

1.4.1.1. Proceso tecnológico de la caña de azúcar

En sus trabajos (Barillas-Figueroa, 2021; Suasnávar-Ardón, 2022), describen que el proceso productivo de la azúcar comienza con la recepción y manejo del cultivo de caña, en donde se determina el peso bruto de la caña de azúcar y se toman muestras de unidades en frecuencia fijada con anterioridad para su análisis. Posterior a la recepción sigue la preparación en donde se busca transformar la caña en un material más homogéneo y denso. En el proceso se llevan a cabo dos acciones: la reducción de longitud de la caña a trozos pequeños utilizando cuchillas giratorias y la desintegración del tejido por la acción de desfibradoras.

Luego de preparar la caña, esta es alimentada a un tándem de molinos en arreglos de cuatro mazas para la extracción del jugo de caña por acción mecánica de los molinos y por acción fisicoquímica al usar inhibición compuesta. Esta última comprende de la alimentación de agua caliente al bagazo encontrado en el último molino y se realiza una retroalimentación en sentido contrario del jugo obtenido hasta alcanzar el segundo molino.

Como resultado anterior se presentan dos corrientes: una de bagazo que es utilizado como combustible en la caldera para la generación de vapor y energía eléctrica requerido en el proceso y la segunda representado por el jugo mezclado de caña que aún posee impurezas como tierra, arena, bagacillo, componentes microbianos, entre otros. Este jugo es dirigido al proceso de clarificación en donde se utiliza ácido fosfórico, sulfatación y altas temperaturas para obtener un jugo clarificado con las características para producir un azúcar de la calidad requerida.

El jugo clarificado es luego calentado para evaporar el contenido de agua y aumentar la concentración de grados Brix para formar la meladura, utilizándose evaporadores dispuestos en arreglo para formar un sistema de evaporación de múltiple efecto. La meladura obtenida es luego clarificada para su remoción de impurezas (principalmente para la producción de azúcar refinada); iniciando con un tratamiento fisicoquímico para generar conglomerados de partículas sólidas y remover sustancias colorantes, se sigue con un calentamiento y finaliza con la inyección de burbujas de aire desde el fondo hacia la superficie para formar una espuma con impurezas fácil de remover.

La meladura ya clarificada es luego materia en dos procesos: desarrollo o crecimiento del cristal de sacarosa y el agotamiento de las mieles (disminución de su pureza aparente). En la cristalización, por método de semilla miento, a la solución con un coeficiente de sobresaturación de entre 1.00 y 1.25 se agrega una cantidad determinada de semilla para propagar la formación de cristales, la adición de agua caliente y evaporación continua permite apartar la viscosidad de la meladura alrededor de los cristales. En la industria, se utiliza un sistema de tres masas y doble magma para el desarrollo del cristal y agotamiento de las mieles, en donde en un

sentido se agota la pureza del material azucarado y en el sentido contrario se desarrolla el tamaño del cristal al deseado. El producto final del agotamiento de las mieles corresponde al residuo denominado como melaza, el cual es usado actualmente como alimento para ganado o sustrato para la producción de etanol usado en la industria de bebidas alcohólicas.

1.4.1.2. Miel final de la caña de azúcar (melaza)

1.4.1.2.1. Miel final de caña de azúcar y su uso en la fabricación de dietas para ganado.

Existen diversidad de melazas (Özbay et al., 2024) y (Conadesuca, 2016), no obstante, la melaza o miel final de caña de azúcar corresponde a un residuo en la fabricación de azúcar en los ingenios. La miel final o miel C se obtiene en la separación consecutivas de mieles que se realiza luego de la evaporación de la meladura y su posterior cristalización (Cerdeña-Mejía et al., 2020). Al principio, la miel final de caña de azúcar (melaza) era considerada únicamente como un “desecho” el cual era utilizado para compactar el polvo de las carreteras de tierras, sin embargo, actualmente dentro de la industria es utilizada como suplemento nutricional en el alimento de ganado, como fuente de carbono en la industria de bebidas alcohólicas, o se vende al extranjero como materia prima para otros procesos (Delgado et al., 2010).

La miel final o melaza en la producción de caña de azúcar puede llegar a representar un problema, incluso de contaminación ambiental por los ingenios azucareros; razón por la cual resulta de interés conocer la importancia de la melaza como fuente de alimentación para animales y su uso en otros procesos para su valorización como puede ser de sustrato para el desarrollo de microorganismos (Zohri et al., 2018).

1.4.1.2.2. Propiedades físico-químicas de la miel final de caña de azúcar (melaza).

La melaza es el residuo de cristalización final del azúcar, del que no se puede obtener más azúcar por métodos físicos. Se elabora mediante la cocción del jugo de la caña de azúcar hasta la evaporación parcial de agua que éste contiene, formándose un producto meloso semi-cristalizado. Su aspecto es similar al de la

miel de abeja aunque de color parduzco muy oscuro, prácticamente negro. El sabor es dulce, agradable, según los expertos, cuanto más oscura sea, más sabor y nutrientes tendrá (Zohri et al., 2018).

A la melaza se le denomina miel final 85° Brix. La denominación Brix es usada para indicar la gravedad específica. La lectura en Brix se usa en la comercialización; de esta manera cuando las lecturas en Brix son usadas en soluciones puras de azúcar, estas indican el porcentaje de azúcares por peso. No obstante, la melaza contiene también ciertos minerales, gomas y otros materiales extraños, por lo que las lecturas en Brix no son un indicador verdadero del total de azúcar o sólidos totales (Mohamed et al., 2024).

Cuando la temperatura aumenta, la viscosidad de la melaza disminuye, por lo que la melaza es más fácil bombearla y mezclarla con otros ingredientes de los piensos. La viscosidad de la melaza puede cambiar con el manejo o bombeo, debido a lo cual, es inusual que a las medidas volumétricas les falte una precisión de hasta 5%. En general, la viscosidad de la melaza es tan alta, que sin disolución, es muy difícil la lectura de ella con el hidrómetro.

La melaza contiene de 75 a 83% de materia seca, 30 a 40% de sacarosa, 2.5 a 4.5% de compuestos nitrogenados (predominado aspartato y glutamato) y aproximadamente, 0.4 a 1.5% de nitrógeno. La melaza contiene de 26 a 40% de sacarosa y de 12 a 25% de azúcares reductores, con un contenido total de azúcar de más de 50 a 60%. El contenido de proteína cruda normalmente es bastante bajo (cerca del 3%) y variable, el contenido de ceniza varía de 8-10%, constituido principalmente por K, Mg, Ca, Cl y sales de azufre (Michel, 2009). Esta tiene un contenido promedio de 50% de azúcares: 33% de sacarosa, 9% de glucosa y 8% de fructosa; además del resto de sólidos en impurezas no deseadas en el producto final cristalizado a comercializar. La producción de la melaza es de 0.03 toneladas por tonelada de caña molida, o, en otras palabras, corresponde a 0.24 toneladas de melaza por tonelada de azúcar para comercializar producida (Cerdeña-Mejía et al., 2020).

1.4.1.2.3. Melaza como medio de cultivo natural.

La melaza de caña de azúcar es una fuente más económica para la producción de productos de valor agregado por fermentación, ya que contiene una gran cantidad de carbohidratos (45-60%), es un subproducto de la industria cañera y es un recurso renovable.

En diversos estudios se evalúa uso como sustrato para la fermentación microbiana; la importancia de bacterias ácido lácticas (BAL), como los *Lactobacillus* sp. a nivel mundial, hace necesario encontrar métodos óptimos para su crecimiento, utilizando sustratos diferentes para su desarrollo, este autor empleó la melaza de caña como sustrato iniciador para el incremento de *L. plantarum* y concluyó que la melaza de caña podría ser usada como sustrato para el desarrollo de estas bacterias (Ossa et al., 2010). (Vidra et al., 2017), estudiaron la producción de ácido láctico a partir de melaza de azúcar mediante fermentaciones discontinuas con resultados favorables. Minari et al., (Minari et al., 2024) comprobó en su investigación la producción de exopolisacáridos (EPS) utilizándose como fuentes de carbono alternativas, la melaza de caña de azúcar y glicerol. Estos residuos de la agroindustria son económicos y su uso contribuye a la sostenibilidad.

También la melaza se utilizó como fuente de carbono y nitrógeno de bajo costo para producir kéfir, empleando para ello la cepa de *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 (Suksawang et al., 2016). Estos autores plantean que los resultados obtenidos muestran que la melaza y las células de levadura utilizadas como sustratos se pueden utilizar como nutrientes de bajo costo para la producción de kéfir. Otro estudio modeló la cinética de fermentación para la síntesis de ácido láctico a partir de melaza de caña de azúcar con *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830, obteniéndose luego de 190.75 h de fermentación, 216.20 g de ácido láctico como producto principal deseado y 302.40 g de ácido cítrico como parte de los subproductos de mayor presencia (Barillas-Figueroa, 2021).

En la evaluación de microorganismos candidatos a probiótico (*L. plantarum* 22 LMC) a nivel de laboratorio en un medio de cultivo con residuos agroindustriales (Vera Mejía et al., 2021). Se empleó un medio natural a partir de melaza (20 %),

suero de leche (33,0 %) y levadura hidrolizada (10,36 %) (MLS), observándose una velocidad de crecimiento y concentraciones de células viables similares a las que se obtienen cuando se utiliza el medio MRS o medio de referencia. Así también dentro de los sustratos empleados para la fermentación con gránulos de kéfir, la melaza de caña es un sustrato a seguir evaluando (Gamba et al., 2019; Tavares et al., 2023).

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS:

2.1. Caracterización de la unidad de estudio: La investigación se realizará en el Laboratorio del Central Azucarero Melanio Hernández Hernández, perteneciente a la Empresa Azucarera de su mismo nombre, ubicada en el poblado de Tuinicu, Municipio Taguasco, provincia de Sancti Spíritus, Cuba y en el Laboratorio de Referencia para la Investigación y Salud Apícola (LARISA).

2.2. Gránulos de Kéfir: Los granos de kéfir de agua se obtendrán del banco de cepas de la Facultad Agropecuaria de la Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez” (UNISS) y del Laboratorio de Referencia para la Investigación y Salud Apícola (LARISA).

2.3. Miel de caña de azúcar: Miel Final (Miel de purga-nombre común), se obtuvo del proceso de Fabricación del Central de la Empresa Agroindustrial Azucarera “Melanio Hernández Hernández”, ubicada en el poblado de Tuinicu, Municipio Taguasco, provincia de Sancti Spíritus, Cuba. El azúcar sin refinar (azúcar morena), fue obtenida de la misma empresa.

2.4. Activación y producción del consorcio microbiano Kéfir de agua. Para la activación del consorcio microbiano o pre fermentaciones (Laureys et al., 2018); 29.59 g de biomasa de los gránulos de kéfir de agua (peso húmedo/peso drenado) fueron inoculados a 211.4 mL de sustrato a base de miel final al 7 % p/v (14.8 g), como principal fuente de carbono e incubado a temperatura ambiente ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 72 horas. Luego, los granos de kéfir fueron filtrados, lavados con agua de grifo y drenados. La producción de biomasa se llevó a cabo constantemente en Beaker con capacidad de 500 mL. Bajo estas condiciones y procedimiento se repitieron los pases hasta alcanzar la masa bacteriana del consorcio microbiano para los restantes ensayos (Figura 2.1).

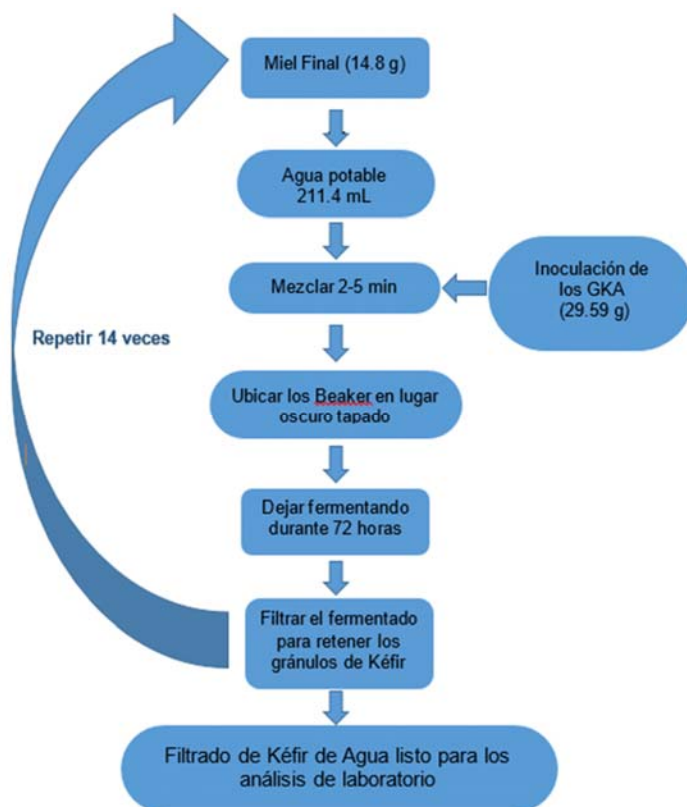


Figura 2.1. Procedimiento de prefermentación de los gránulos de kéfir de agua (GKA): Se parte de la proporción de 7 % miel final y 14% de kéfir.

2.5. Ensayo de repetitividad.

2.5.1. Preparación del sustrato y fermentación. Se prepararon para el proceso de fermentación tres Erlenmeyer de 500 mL en condiciones asépticas, se le añadió la miel final de azúcar de caña diluida al 7% p/v. Posteriormente los GKA (94-99g) se inocularon en solución de miel final de caña de azúcar al 7 % p/v. Los GKA se incubaron durante 72 h a temperatura ambiente (27 ± 2 °C) y Humedad relativa (66.9 %) con la boca del frasco tapada con conos de colcho (Figura 2.2). A las 72 h se retiraron los GKA mediante tamizado para su pesaje y se tomó una muestra del filtrado para medirle el pH. Este proceso se repitió por 14 ocasiones.

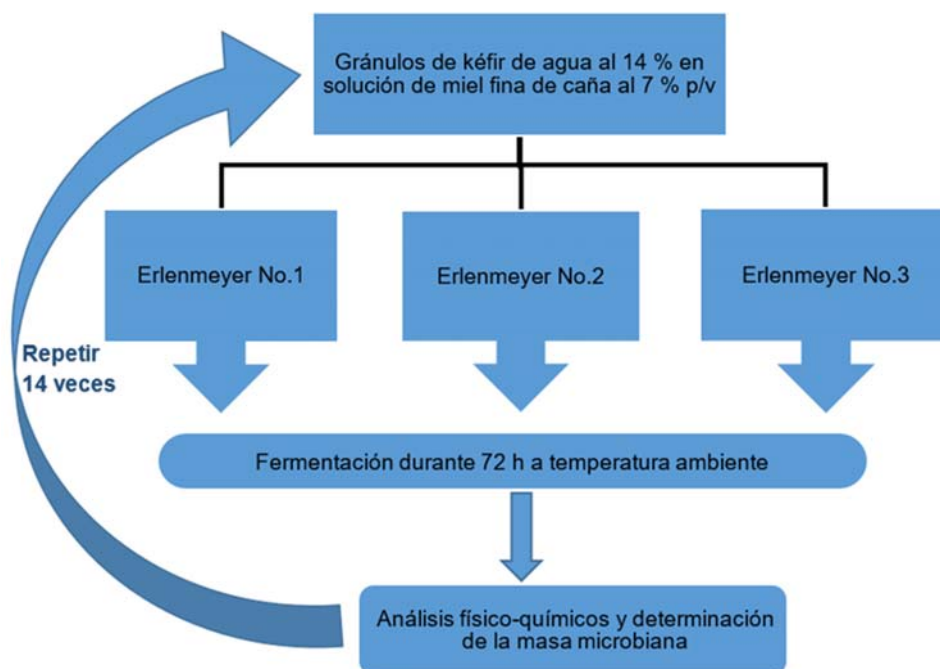


Figura 2.2. Procedimiento del ensayo de repetitividad

2.6. Ensayo de reproducibilidad.

2.6.1 Preparación del sustrato y fermentación. Se prepararon por triplicado tres soluciones diferentes de miel final de caña de azúcar como sustrato para el proceso de fermentación (Figura 2.3). A cada Erlenmeyer en condiciones asépticas (500 ml), se le añadirá la miel final de azúcar de caña diluida al 9, 7 y 5 % p/v (Tabla 1). Posteriormente se añadieron al sustrato azucarado 28 g de granos de kéfir (que se pueden obtener para ensayos de reproducibilidad). El proceso de fermentación se realizará por un período de 72 h a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) y Humedad relativa (66.9 %). Se recolectaron muestras del filtrado de kéfir en cada momento de los pases para la determinación de las variables de estudio al representar tres réplicas biológicas del mismo lote. Se realizaron pases cada 72 h durante 6 ocasiones.

Tabla 1. Esquema de experimento

Tratamientos	Solución del Sustrato (%)	Kéfir de agua (%)	Agua destilada (%)	Repeticiones	Réplicas por sustratos	Número de Erlenmeyer
T1	9	14	77	3	6	18
T2	7	14	79	3	6	18
T3	5	14	81	3	6	18

2.7. Análisis de la cinética de fermentación.

2.7.1. Análisis cuantitativos

La investigación científica conlleva la determinación cuantitativa y el monitoreo de diversas propiedades físicas, químicas y microbiológicas del objeto de estudio.

Los análisis químicos son aquellos que determinan la composición química de un material o muestra, mediante diferentes métodos de laboratorio.

A la miel final de caña de azúcar como materia prima para utilizar como sustrato en los diferentes análisis de laboratorio se le realizaron los siguientes análisis: Sólidos solubles, Azúcares totales, pureza y pol, siguiendo para ello los procedimientos descritos en la norma ramal de la Agricultura (NRA-1:07, 2007).

Con base en los objetivos de la presente investigación, únicamente se evaluó un parámetro químico, el cual está directamente relacionado con la acidez, acidez activa (pH).

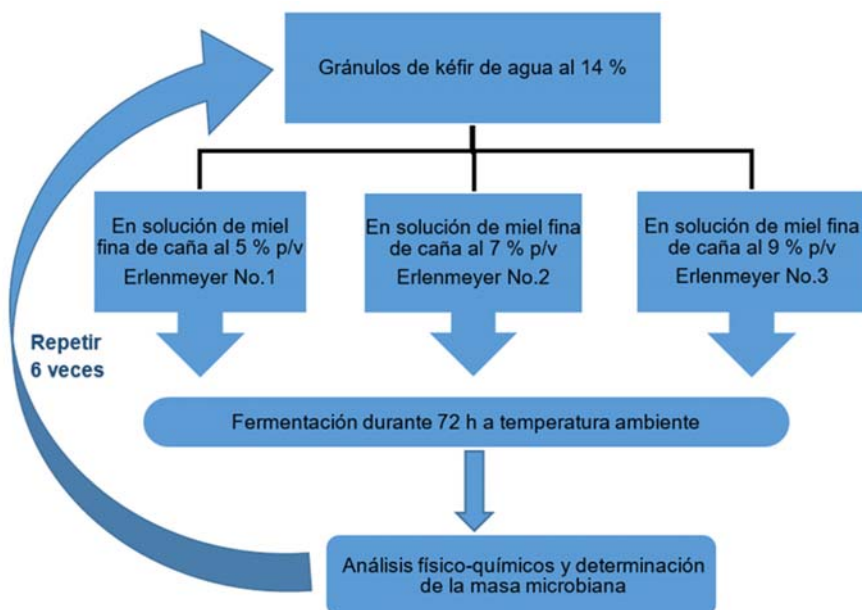


Figura 2.3. Procedimiento del ensayo de reproducibilidad

2.7.2. Acidez activa. La acidez activa cuantifica la actividad de los iones hidronio (H_3O^+) en una solución, expresada en términos de pH. El término pH es definido como el logaritmo negativo de base 10 de la concentración molar de los iones hidronio. Sin embargo, la definición real es el logaritmo negativo de base 10 de la actividad de los iones hidronio y no de su concentración.

$$pH = -\log_{10} A_{H^+} = \log_{10} (H^+) \cdot \gamma_{H^+}$$

Es necesario mencionar que la actividad de una especie es su concentración multiplicada por su coeficiente de actividad, el cual es una medida de la desviación respecto al comportamiento ideal. Si el coeficiente de actividad fuera 1, el comportamiento sería ideal. En la naturaleza, el pH puede abarcar un rango de 14 órdenes de magnitud, los cuales se expresan en una escala que va desde 0 hasta 14 en soluciones acuosas. Este parámetro es importante debido a que existen algunos procesos que son más dependientes de esta actividad que de la acidez total, como la habilidad de crecimiento de los microorganismos en un determinado alimento.

En el presente estudio el análisis del pH se determinó por potenciometría directa, utilizando un medidor de pH digital (Modelo: PL1502E, Marca: Mettler Toledo, República China); y en correspondencia con los procedimientos descritos en el MACU (Perez-Sanfiel, 2006).

2.7.3. Sólidos solubles/Brix: La determinación de sólidos solubles se realizará por refractometría digital, mediante la medición de °Brix en un refractómetro (Modelo: Abbemat 3000, Anton Paar, Alemania), con una escala de 0 a 32 °Brix.

Esta variable se utiliza como indicador del contenido de azúcares en jugos ya que son los principales sólidos disueltos en estos, conteniendo además pectinas solubles, ácidos orgánicos y aminoácidos, entre otros.

Por lo tanto, representa únicamente la cantidad de sólidos disueltos totales en la muestra como si éstos fueran exclusivamente sacarosa. Durante la fermentación, los azúcares contenidos inicialmente son transformados por los microorganismos en diversos compuestos orgánicos, reduciendo la densidad de la solución. Por lo que un valor constante en la densidad indica la finalización de la fermentación.

Procedimiento: Se homogeniza la porción de ensayos y transfiere 100 ml del filtrado de kéfir de agua a un beaker de 250 ml. Después de mantener el refractómetro limpio y seco, se coloca una gota de la muestra del filtrado de kéfir sobre el prisma utilizando para ello una varilla plástica, cerrándolo rápidamente para evitar evaporaciones. Esperar 5 min para que la muestra adquiera la temperatura del prisma y se hace la lectura. En paralelo se toma la temperatura de la muestra del kéfir para corregir en la tabla de referencia (Perez-Sanfiel, 2006). Los resultados fueron expresados en % Brix.

2.7.4. Pol: El método se fundamenta en el porcentaje de sólidos solubles poliméricos, sumatorio de azúcares en un material azucarado.

Procedimiento: Se homogeniza la muestra del filtrado de kéfir de agua en un beaker de 250 ml y se transfiere a la capsula 26.00 ± 0.01 g del filtrado de kéfir para depositarlo en un matraz de 100 ml. Se le añade en esta agua destilada hasta 80 ml, 2 ml de la solución de quimipax y 1 ml de hidróxido de sodio de 1 mol/litros. Se mezcla mediante rotación y enrase hasta el aforo y se agita con vigor. (Si al enrasar

se dificulta esta operación se usan 2 o 3 gotas de alcohol). Posteriormente se filtra a través de papel de filtro y desechan los primeros 10 ml del filtrado, tapando el filtrado con vidrio reloj para determinar la lectura en un polarímetro. Los resultados fueron expresados en % Pol = lectura del polarímetro (Perez-Sanfiel & F., 2006).

2.7.5. Pureza: Es un método indirecto que parte del porcentaje obtenido entre la sacarosa y los sólidos solubles totales ($\% \text{ Pol} / \% \text{ Brix} \times 100$) (Perez-Sanfiel, 2006).

2.8. Determinación de las biomásas húmedas de granos de kéfir de agua (peso drenado).

Los análisis físicos son aquellos que determinan las propiedades y el comportamiento de la energía, la materia, el tiempo y el espacio, así como las interacciones entre dichos conceptos. Con base en los objetivos de la presente investigación, únicamente se evaluó un parámetro físico: peso drenado.

El peso drenado, denominado también como biomasa húmeda o escurrida, es la cantidad de materia sólida o semisólida presente después de que el contenido en exceso del líquido en el que se encuentra se separa completamente.

Los cambios en las biomásas de los granos de kéfir de agua en los fermentados se midieron cada 3 días (72 h), mediante gravimetría. Para ello, los granos se separaron asépticamente utilizando tamices o colador plástico (0.84 mm) después de la fermentación. Los granos se lavaron con agua potable de grifo y se dejan reposar por 3 min para eliminar el exceso de agua. Después de ese tiempo se transfirieron a un beaker previamente tarados para ser pesados los granos de kéfir de agua utilizándose una balanza analítica (Modelo: PFB 2000-2, Kern, Alemania). El incremento de la biomasa de los granos de kéfir de agua (IMGKA), se expresó a partir de la diferencia entre la masa final de los GKA (PF) con relación al peso inicial (PI) (g), así como su porcentaje de incremento ($\% \text{ IMGKA}$).

$$\text{IMGKA} = \text{PFMGKA} - \text{PIMKA}$$

$$\% \text{ IMGKA} = \text{PFMGKA} - \text{PIMKA} \times 100$$

2.9. Análisis estadístico: Todos los experimentos se repitieron tres veces y los resultados experimentales se expresaron como media \pm desviación estándar de la media y luego se someterán a un análisis de varianza unidireccional (ANOVA)

utilizando SPSS 18.0 (SPSS, 2010). Se considera estadísticamente significativo un valor de $P < 0,05$.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la prefermentación o activación de los GKA a nivel del laboratorio, se siguió el procedimiento descrito por (Laureys et al., 2018) pero en el presente estudio se valoró como sustrato la miel final de caña de azúcar. Los resultados descritos en la tabla 2.1, reflejan a partir de los valores medios una disminución del pH de 2.138, que expresado en porcentaje es del 62 %, asumiéndose este indicador como método indirecto del crecimiento microbiano (Hernández-García et al., 2021), se denota el crecimiento del consorcio microbiológico que conforman los GKA.

Como valor medio se destaca también en la misma tabla, el incremento de masa GKA ($12,026 \pm 16,790$) y su expresión en porcentajes ($115,561 \pm 25,272$); en la cinética de ese crecimiento (Figura 3.1), se observa que hay una tendencia a incrementar la masa microbiana a través de los diferentes pases pero los porcentajes disminuyen haciéndose más notable a partir del pase número 5 (Figura 3.2); no obstante, se pone de manifiesto que la miel final constituye un sustrato para la prefermentación de los GKA, llegándose a alcanzar los gramos necesarios para los siguientes ensayos.

Tabla 3.1. Descripción estadística de la activación de los gránulos de kéfir de agua a nivel de laboratorio.

	Pases	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
pH antes	17	5,669	0,511	4,99	6,90
pH después	17	3,531	0,302	3,00	4,00
Disminución de pH	17	2,138	0,655	,99	3,40
% de disminución pH	17	62,861	8,824	50,72	80,16
Gramos de Kefir	17	142,016	47,437	29,59	222,00
Incremento de masa GKA	16	12,026	16,790	-10,79	57,00
% de incremento	16	115,561	25,272	93,86	188,14

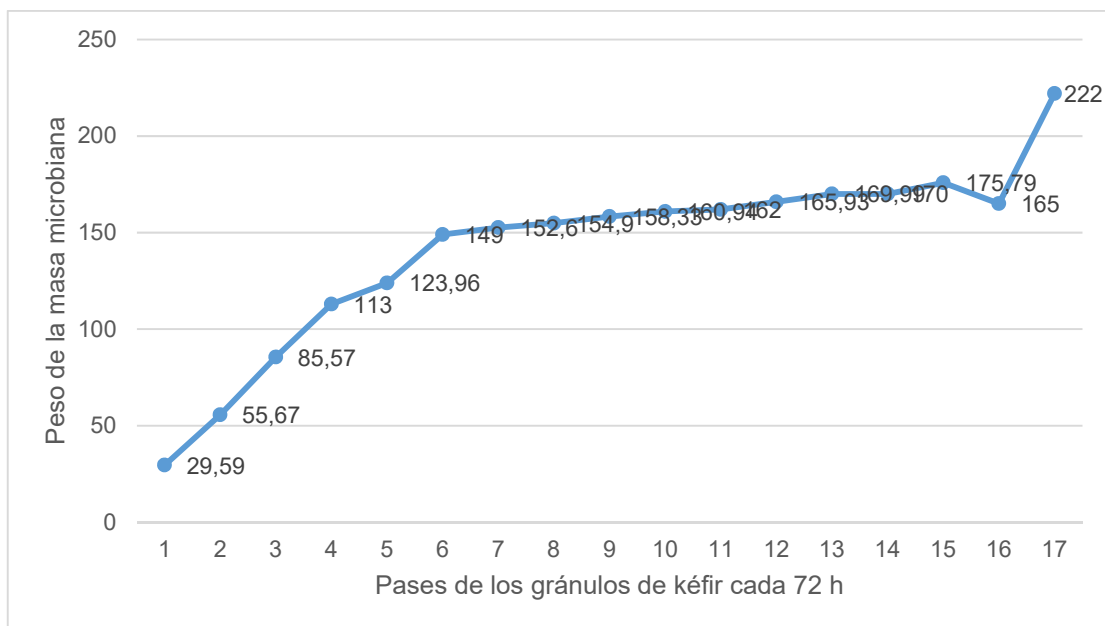


Figura 3.1. Cinética de la masa microbiana de los gránulos de kéfir de agua en sustrato a base de miel final durante los diferentes pases en el laboratorio (17 pases).

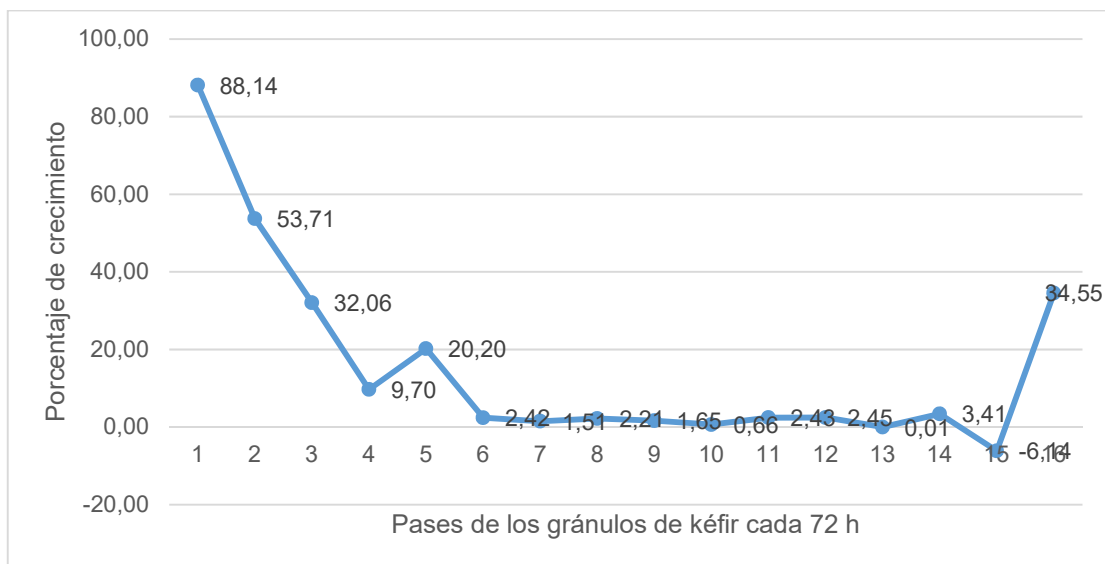


Figura 3.2 Porcentaje de crecimiento de la masa microbiana de los GKA en sustrato a base de miel final durante los diferentes pases en el laboratorio (17 pases).

A partir de la masa de los GKA alcanzada en la fase de activación se procedió al montaje de tres muestras con pesajes dentro del mismo rango (R1-93,96, R2-98,57 y R3-96,51), para ver su comportamiento a través de diferentes pases en el tiempo. Los resultados mostraron que existió diferencias significativas ($p \leq 0,05$), entre los valores medios de incrementos de la biomasa (Tabla 3.2), viéndose favorecida la réplica 2, lo que pone de evidencia que no fueron los gramos de partida la causa principal porque no hay diferencias entre las restantes réplicas. Mostrándose en la cinética de ese crecimiento una tendencia ascendente en las tres réplicas (Figura 2.3), aunque los valores de incremento alcanzado son inferiores al que se obtuvo en la prefermentación. Sin embargo, cuando se analizan las variaciones de pH (Tabla 3.3), no existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$), entre las réplicas, con una cinética expresada en porcentaje muy similar (Figuras 3.6 y 3.7) y en el rango de la encontrada en el ensayo de prefermentación.

Tabla 3.2. Incremento medio de la biomasa de los Gránulos de kéfir de agua (g) durante el período de la fermentación de las réplicas (n=13).

Replicas	Pases	Media	DS	ES	Mínimo	Máximo
1	13	1,90 ^a	1,651	0,458	0,95	7,25
2	13	3,88 ^b	2,298	0,637	-1,00	8,44
3	13	1,45 ^a	0,686	0,190	0,95	3,62
Total	39	2,41	1,954	0,313	-1,00	8,44

Leyenda: Valores expresados en Media \pm DS (Desviación Estándar). Superíndices diferentes, en una columna, denotan diferencias significativas entre réplicas ($p \leq 0,05$).

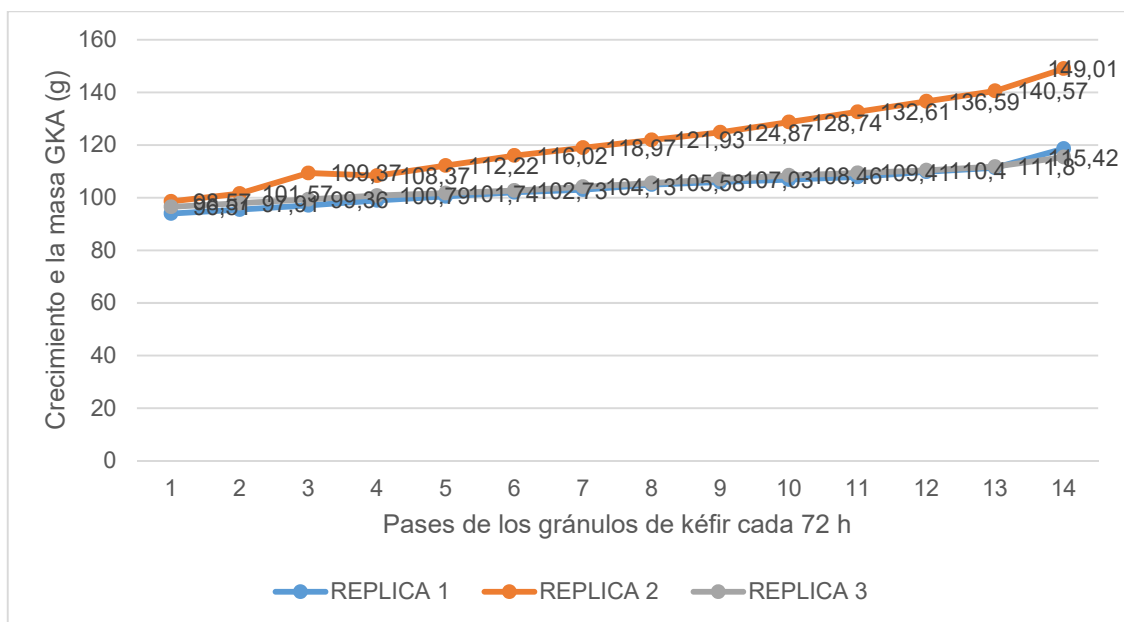


Figura 3.3. Réplicas de la cinética de crecimiento de la masa de los GKA en los diferentes pases (14). n=3

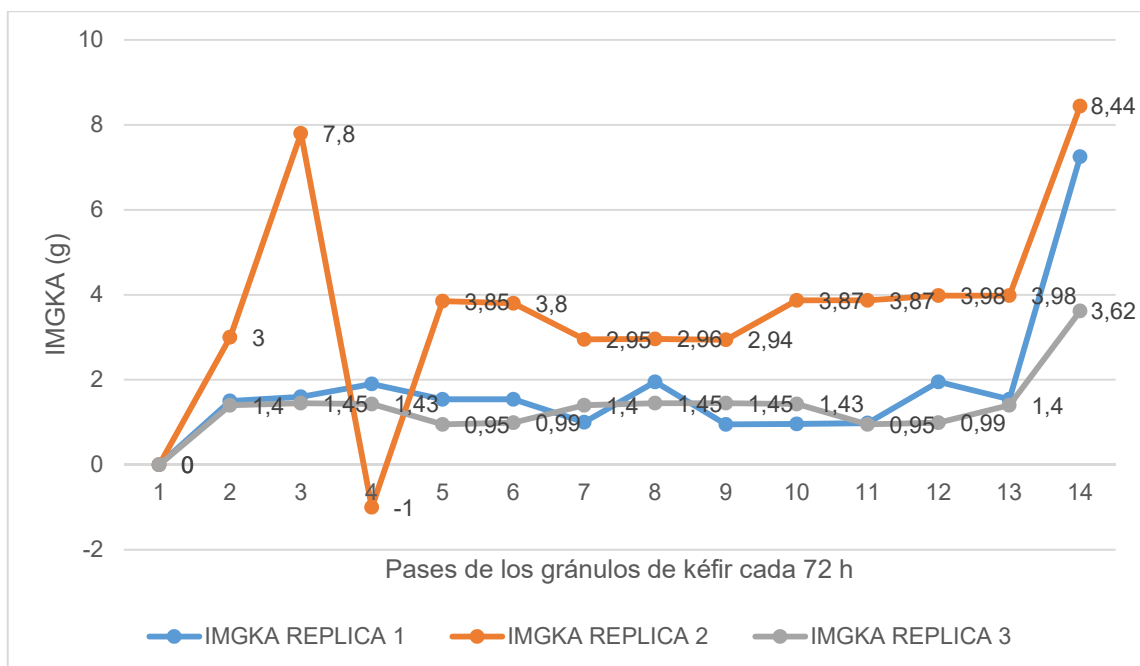


Figura 3.4. Comportamiento en gramos del incremento de la masa de los gránulos de kéfir de agua (IMGKA), durante la secuencia de lecturas de las réplicas.

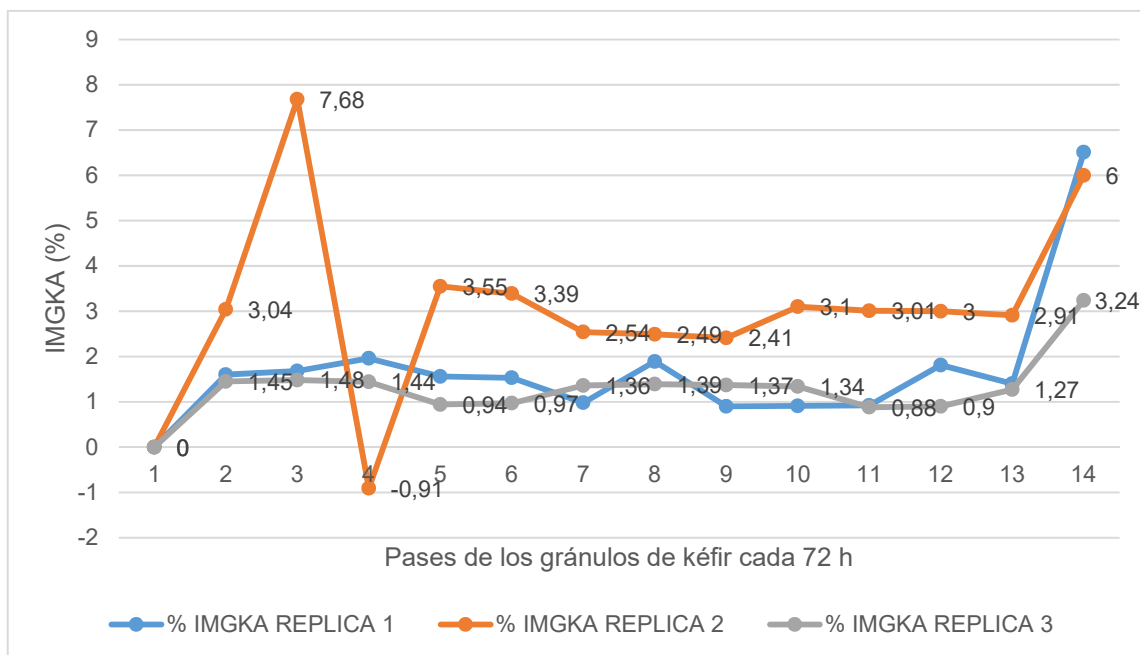


Figura 3.5. Incremento de la masa de los gránulos de kéfir de agua (IMGKA), durante la secuencia de lecturas de las réplicas expresada en porcentaje.

Tabla 3.3. Valores medios de pH inicial y final en la totalidad de los pases de fermentación (n=14)

Replicas	Pases	pH inicial		pH final		Diferencial de pH	
		Media	DS	Media	DS	Media	DS
1	14	5,54 ^a	,323	3,47 ^a	,324	2,07 ^a	0,267
2	14	5,57 ^a	,306	3,53 ^a	,272	2,04 ^a	0,287
3	14	5,60 ^a	,264	3,50 ^a	,315	2,11 ^a	0,290
Total	42	5,57	,2923	3,50	,298	2,07	0,276

Leyenda: Valores expresados en Media \pm DS. ($p \leq 0,05$).

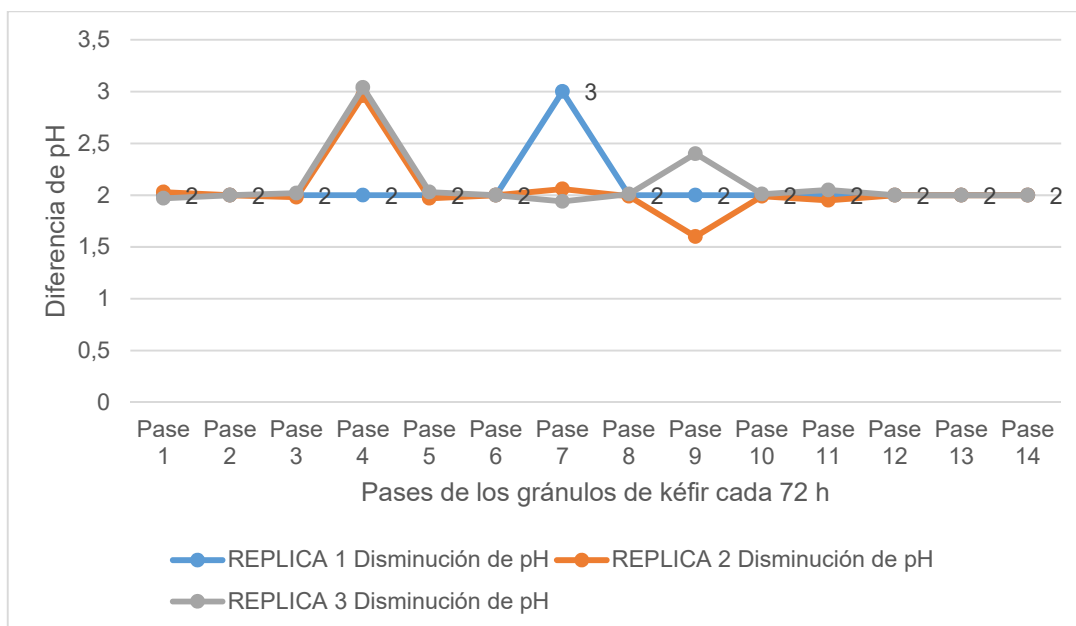


Figura 3.6. Diferencia de pH de las réplicas durante el proceso de fermentación de los gránulos de kéfir de agua (IMGKA) en el sustrato de miel final (14 pases).

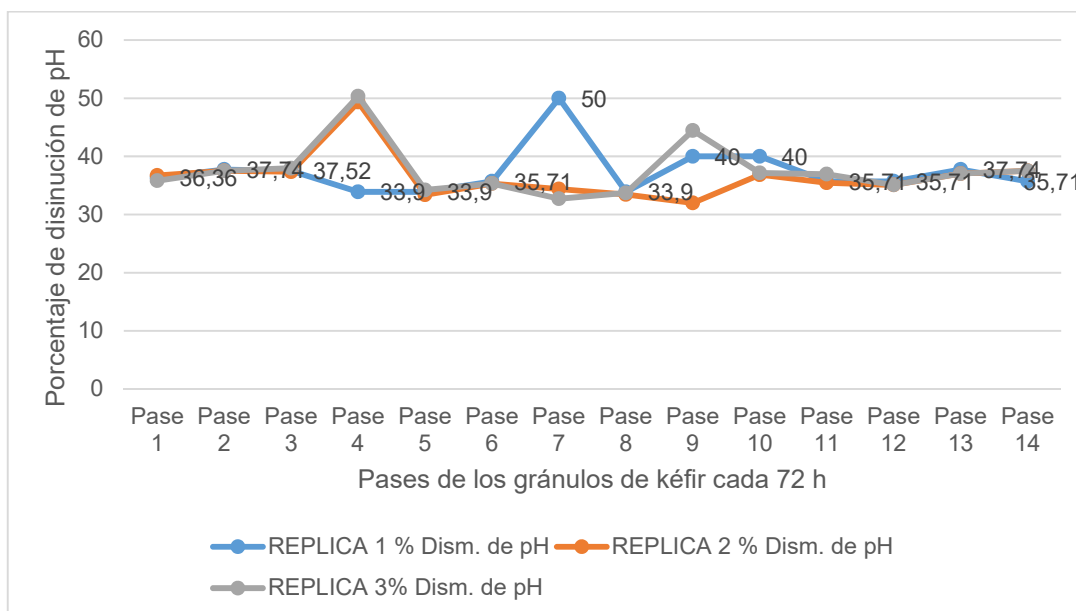


Figura 3.7. Diferencial de pH de las réplicas durante el proceso de fermentación de los gránulos de kéfir de agua en el sustrato de miel final, expresada en % (14 pases).

Teniendo en consideración que la miel final de caña de azúcar constituía un sustrato con potencialidades para ser usado en el proceso fermentativo de los GKA, se evaluaron tres concentraciones de la misma para buscar niveles de optimización, el ensayo incluyó 3 réplicas con 6 repeticiones en cada concentración. El análisis de varianza donde los factores eran concentraciones de miel, números de pases y réplicas; mostró que en las réplicas nunca hubo diferencias significativas entre ellas en ninguna de las variables. Cuando se hizo el análisis entre las concentraciones (Tabla 3.4), se observa que la concentración de 5 % difiere significativamente ($p \leq 0,05$) en las variables de pH final, diferencial de pH, Brix, Pol y Pureza, no obstante en el caso del pH es favorable para la concentración del 5 %, si lo asumimos como indicador indirecto de la actividad microbiana.

Tabla 3.4. Comportamiento de las variables analizadas en el proceso de fermentación de los GKA en las diferentes concentraciones de miel final.

Concentración	n	5%		7%		9%	
Variables		Media	DS	Media	DS	Media	DS
Incremento en peso	18	35,78 ^a	20,975	35,28 ^a	21,581	32,83 ^a	20,124
pH Inicial	18	6,59 ^a	0,151	6,51 ^a	0,138	6,57 ^a	0,124
pH Final	18	3,23 ^a	0,028	3,40 ^b	0,135	3,35 ^b	0,111
Diferencia de pH	18	3,37 ^a	0,155	3,11 ^b	0,185	3,22 ^b	0,173
Brix	18	2,27 ^a	0,154	2,76 ^b	0,042	3,53 ^c	0,020
Pol	18	0,24 ^a	0,014	0,27 ^b	0,008	0,30 ^c	0,009
Pureza	18	10,39 ^a	0,279	9,65 ^b	0,273	8,44 ^c	0,279

Leyenda: Valores expresados en Media \pm DS (Desviación Estándar). Superíndices diferentes, en una columna, denotan diferencias significativas entre concentraciones ($p \leq 0,05$).

El análisis de las mismas variables en los pases de fermentación incluidos dentro del experimento (Tabla 3.5), muestra que solo existió Diferencias significativa en el incremento de la masa microbiana de los GKA con relación al segundo pase. Es significativo que en la cinética de crecimiento cuando se valoraron los % de incrementos de la masa microbiana de los GKA; estos parten de un valor superior al 89 % y llegan al 6to pase a un valor superior al 25 % (Figura 3.8). No obstante, en el caso del pH el porcentaje de incremento tuvo mayor estabilidad, encontrándose en todos los casos por encima del 48% (Figura 3.9).

Tabla 3.5. Comportamiento de las variables analizadas en el proceso de fermentación de los GKA en los diferentes pases de las concentraciones de miel final (n=6).

Pases (72h)	Incremento peso	pH Inicial	pH Final	Diferencia de pH	Brix	Pol	Pza
1ero	0,00 ±0	6,58 ^a ±0,058	3,29 ^a ±0,076	3,28 ^a ±0,118	2,82 ^a ±0,573	0,27 ^a ±0,029	9,57 ^a ±0,899
2do	26,22a ±2,539	6,53 ^a ±0,166	3,31 ^a ±0,092	3,21 ^a ±0,228	2,84 ^a ±0,542	0,27 ^a ±0,027	9,61 ^a ±0,906
3ero	31,78ab ±5,039	6,60 ^a ±0,059	3,34 ^a ±0,105	3,26 ^a ±0,134	2,91 ^a ±0,513	0,27 ^a ±0,026	9,44 ^a ±0,802
4to	47,84bc ±7,608	6,58 ^a ±0,073	3,35 ^a ±0,214	3,22 ^a ±0,263	2,82 ^a ±0,599	0,26 ^a ±0,037	9,51 ^a ±0,760
5to	42,94cd ±10,156	6,60 ^a ±0,055	3,32 ^a ±0,110	3,27 ^a ±0,154	2,89 ^a ±0,537	0,27 ^a ±0,030	9,42 ^a ±0,822
6to	59,00 ±14,950	6,46 ^a ±0,269	3,33 ^a ±0,120	3,13 ^a ±0,257	2,84 ^a ±0,563	0,26 ^a ±0,020	9,39 ^a ±1,131

Leyenda: Valores expresados en Media ± DS (Desviación Estándar). Superíndices diferentes, en una columna, denotan diferencias significativas entre los pases ($p \leq 0,05$).

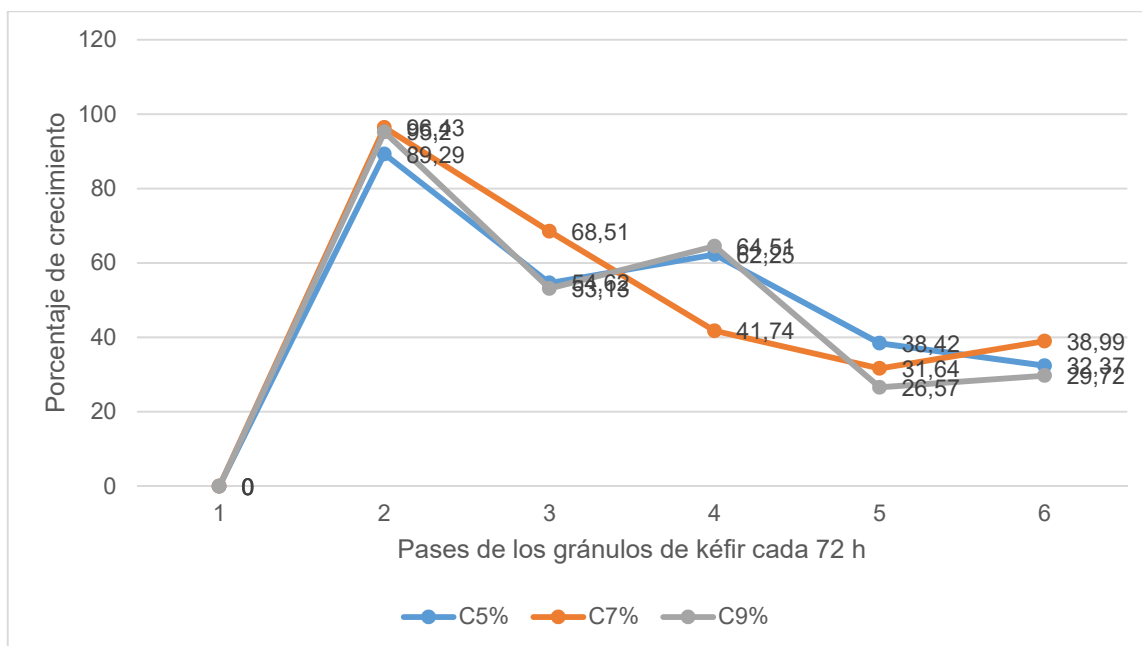


Figura 3.8. Incremento de la masa de los gránulos de kéfir de agua (IMGKA), de las diferentes concentraciones de miel final expresada en porcentajes durante la secuencias de lecturas (n=6).

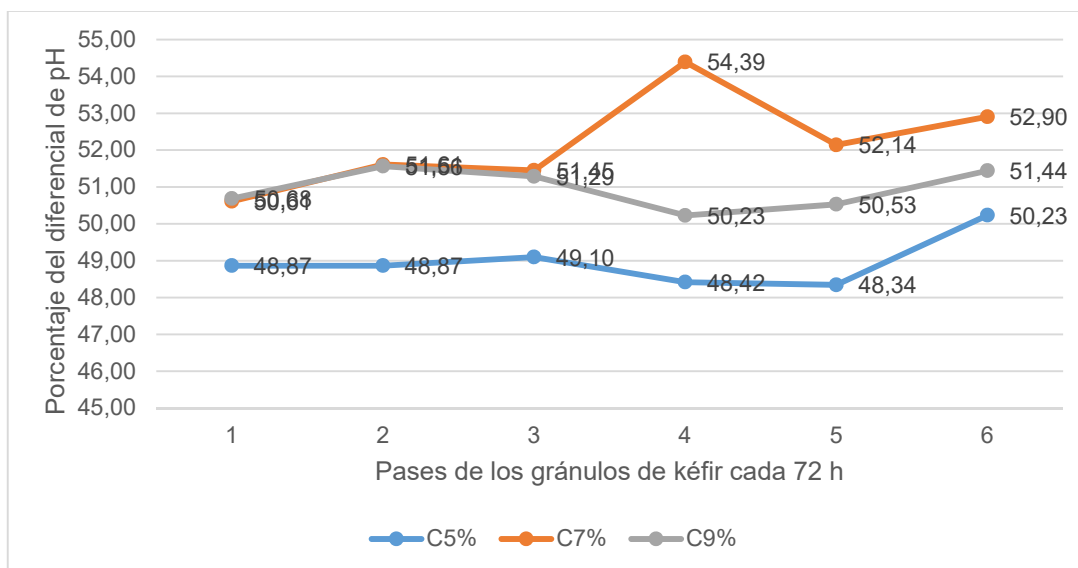


Figura 3.9. Diferencial de pH de las réplicas durante el proceso de fermentación de los gránulos de kéfir de agua en el sustrato de miel final a diferentes concentraciones, expresada en % (6 pases).

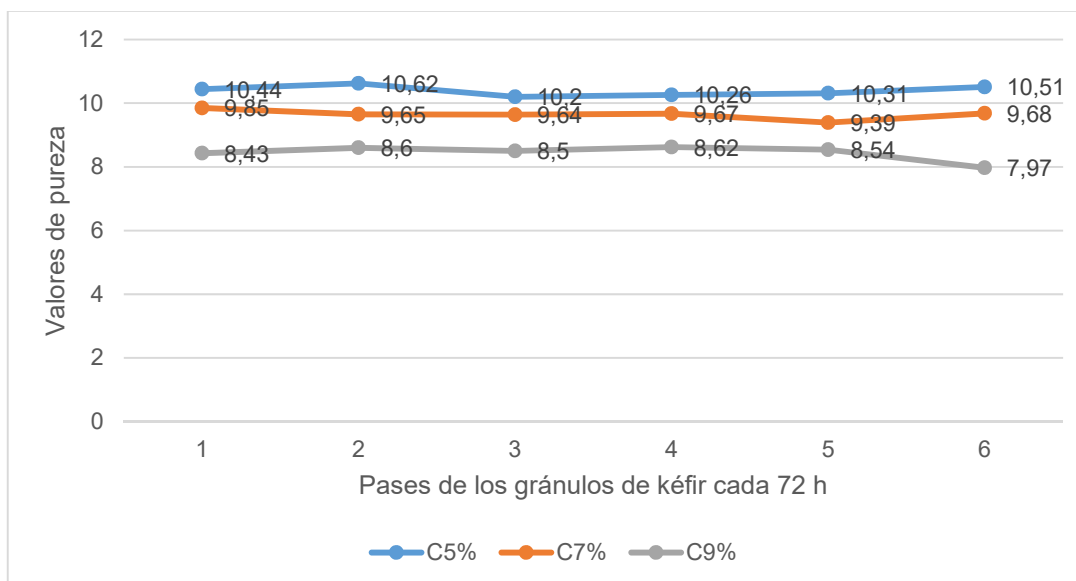


Figura 3.10. Comportamiento de la pureza alcanzada al final de la fermentación de los gránulos de kéfir de agua en el sustrato de miel final a diferentes concentraciones.

DISCUSIÓN

Las actividades agrícolas y agroindustriales generan miles de toneladas de subproductos. Convertir estos subproductos agrícolas en sustratos valiosas sería una parte viable, sostenible y respetuosa con el medio ambiente en el proceso de gestión de los mismos. Al reciclar para fabricar nuevos productos, el proceso contribuye al valor socioeconómico y al mantenimiento de la salud ambiental y allana el camino para lograr la seguridad y una economía circular (Supriya et al., 2023), con este principio en el presente trabajo se investigó la posibilidad de utilizar la miel final de caña de azúcar como sustrato en la fermentación de los granos de kéfir de agua.

La fermentación del kéfir de agua se llevó en el presente trabajo en tres momentos, prefermentación, repetibilidad (por triplicado) y reproducibilidad, de las variables evaluadas el pH fue el que más constante se mantuvo después de las 72 h. La biomasa fluctuó entre ensayo y dentro del mismos ensayo en los diferentes pases.

Son pocos los reportes que utilizan como sustrato la miel final de caña de azúcar. En la evaluación del fermentado de Kéfir de agua desarrollado en medio natural a base de miel final de caña de azúcar para su uso como aditivo zootécnico se obtiene un incremento medio de la masa bacteriana de 30.16 ± 15.01 , pero este tampoco fue estable en todos los pases $4.11^b \pm 0.058$ (Hernández-García et al., 2024)

En otros estudios, los cambios reportados en la biomasa de los granos de kéfir de agua utilizados como cultivo iniciador natural para producir bebidas fermentadas a partir de diferentes azúcares como sustratos, en pases durante 5 semanas. En general, se pudieron observar diferencias significativas entre las muestras en las mismas semanas hasta la tercera semana ($P > 0.05$). Pero, después de la tercera semana, se encontró que la biomasa del grano de kéfir de agua de las muestras con melaza y miel de abejas como sustratos era mayor que el resto ($P < 0.05$); los mayores incrementos lo encontraron en la 5ta semana con 2.19 ± 0.18 y el menor en azúcar sin refinar en esta misma semana con 1.92 ± 0.14 (Çevik et al., 2019), valores que se corresponden con los encontrados en el ensayo de repetibilidad (2.41 ± 1.95) del presente trabajo.

En estudios a nivel de laboratorio utilizando diferentes medios de cultivos estandarizados donde se incluyó la melaza diluida a 14° Bx más 15 g/L de agar bacteriológico (MM), se observó que el promedio de la biomasa cultivable, independientemente de las composiciones nutricionales específicas de los otros medios, favoreció el crecimiento de toda la comunidad en la fermentación. La biomasa total en el medio fue la más baja después de 72 h (4.22×10^7 UFC/ml), lo que refleja una fase estacionaria con una ligera pendiente negativa (Arrieta-Echeverri et al., 2023).

El crecimiento de los granos de kéfir de agua (basado en la masa húmeda) fue similar para las series de fermentación bajo condiciones de aeróbicas y anaerobiosis, y disminuyó en el transcurso de los ocho pases de la serie de fermentación según (Laureys et al., 2018), comportamiento este último similar al del presente estudio.

En el presente estudio los incrementos de la masa microbiana no se mantuvo estable en todos los ensayos, no obstante, en el ensayo de reproducibilidad en las diferentes concentraciones evaluadas (5, 7 y 9 % de melaza), los valores medios se encontraban por encima del 35 % en los 6 pases realizados, con pico superior al 40 % en el tercer pase, (Laureys et al., 2018) reportaron que el crecimiento del grano de kéfir de agua (basado en la masa húmeda) fue de alrededor del 60 % para todas las series de fermentación y se mantuvo más o menos estable durante el transcurso de ocho pases en algunas de los sustratos utilizados, mientras que en otras disminuyó lentamente, denotando variaciones en función de la concentración de nutrientes.

En valoraciones del crecimiento de los granos de kéfir de agua en diferentes sustratos y condiciones de oxígeno se alcanzan crecimientos al final de los 8 pases entre $2,7 \pm 0,5$ y $52,0 \pm 2,3\%$ (Laureys et al., 2019); incrementos de biomasa comparables a los encontrados en el presente trabajo.

En estudios previos se comprobó que la capacidad tampón y la concentración de calcio del agua utilizada para la fermentación del kéfir de agua tienen impacto en el crecimiento del grano de kéfir de agua, la diversidad de especies microbianas, así como la producción de metabolitos durante el proceso de fermentación del kéfir de agua (Laureys et al., 2019). Se reporta que el estrés ácido excesivo disminuye el crecimiento del grano de kéfir de agua durante la fermentación; no obstante, esta disminución no puede atribuirse solamente a la desaparición de determinadas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL); se señalándose que las glucansucarasas producidas por las BAL, que son responsables del crecimiento del grano de kéfir de agua, son enzimas extracelulares, cuya actividad es óptima a un pH de 4,0 a 5,5 y disminuye hacia valores de pH más bajos (Côté & Skory, 2012.,Waldherr et al., 2010).

De manera similar, la producción de exopolisacáridos (EPS) por parte determinadas especies de BAL es óptima alrededor de un pH de 4,5 a 5,5 (Cheirsilp et al., 2001; Kimmel et al., 1998). Sin embargo, en el estudio de (Laureys et al., 2019), el crecimiento de los granos de kéfir de agua se mantuvo alto durante los dos primeros

pasos de las series de fermentación cuando no utilizó solución tampón, a pesar de sus bajos valores de pH. Esto indicó que era más probable que los valores bajos de pH comprometieran el crecimiento del grano de kéfir de agua, al inhibir la producción de glucansucrasas durante la fermentación que al inhibir la actividad de la glucansucrasa en sí, situación que pudo estar presente en las variaciones de los incrementos de masa microbiana de esta investigación.

Se señala que la proliferación de bacterias ácido acéticas (BAA) en la fase de fermentación aeróbica da como resultado altas concentraciones de ácido acético y, por tanto, bajos valores de pH, estas condiciones pueden disminuir el crecimiento de los gránulos de kéfir de agua, ya que el estrés ácido excesivo tiene ese efecto (Laureys & De Vuyst, 2017).

Los valores de pH pueden variar en función de los sustratos y condiciones de fermentación (Laureys et al., 2018). En la presente investigación se evaluó la miel final de caña de azúcar como sustrato, observando que los valores medios de pH al final de la fermentación en el primer ensayo (prefermentación) fue de $3,53 \pm 0,30$, en el segundo (repetibilidad) de $3,50 \pm 0,30$ y en el tercero (reproducibilidad) de $3,23 \pm 0,03$ para la concentración de miel de 5 %, $3,40 \pm 0,14$ para la de 7% y $3,35 \pm 0,11$ para la de 9%, en todos los casos estuvo por debajo del reportado en estudio previo cuando evaluaron el fermentado de Kéfir de agua obtenido a partir de un medio natural a base de miel final de caña para su uso como aditivo zootécnico, reportándose un pH de 4.11 ± 0.06 (Hernández-García et al., 2024).

En otro estudio con diferentes sustratos, el valor de pH durante el crecimiento de los granos de kéfir de agua fueron similares en las series de fermentación aeróbica y anaeróbica en el estudio de ocho pases diferentes (Laureys et al., 2018). El pH al final del proceso de fermentación en los diferentes sustratos vario entre 3.35-3.65 (Laureys et al., 2018); rangos de pH similares a los del presente estudio.

En estudio realizado por (Hidalgo Guerrero, 2023), con diferentes sustratos azucarados reporta que en los resultados del análisis de pH; los sustratos con Azúcar blanca y te negro y Azúcar morena y naranja demostraron un valor de 3,87 que fue la mayor acidez a diferencia del sustrato a base de Azúcar blanca y limón

y Azúcar morena y Te negro que establecieron un valor de 3,53 indicando que las bebidas se encuentra en una escala ácida. (López-Rojo et al., 2017) menciona que la fermentación con kéfir de agua de piña utilizando tíbicos alcanzó un pH de $4,67 \pm 0,02$, por otra parte (Nastar Marcillo, 2022), indica que en la producción de bebidas funcionales con gránulos de kéfir de agua a partir de materias primas como suero de leche y jugos de frutos andinos, el pH al final de la fermentación fue de 4.1. (Tirado Vera & Zambrano Llor, 2021) argumenta que en el uso de 5% de Hierba luisa y 6% de kéfir se obtiene un pH de 5.

La acidificación observada durante la fermentación en el presente estudio es causada principalmente por BAL, BAA y levaduras que consumen principalmente azúcares presentes en el sustrato. Resultados más altos de pH son reportados por (Güzel-Seydim et al., 2023) que encontraron rango de 4,00 - 4,07, en función del sustrato; en esa investigación el pH disminuyó significativamente durante la fermentación de kéfir a base de caqui de 6,02 (0 h) a 4,07 (42 h). En otros estudio donde se aumentó las proporciones de granos de kéfir de agua en el jugo de uva provocó una ligera variación del pH de 2,94 a 2,89 (S. A. d. Santos et al., 2023).

Los valores de pH del kéfir de agua elaborado a partir de orujo y jugo (0 h) fueron $3,72 \pm 0,05$ y $3,63 \pm 0,07$, respectivamente, mientras que el pH disminuyó en la muestra de kéfir elaborado a partir de orujo ($3,39 \pm 0,01$) pero aumentó ligeramente en el kéfir producido a partir de jugo ($3,59 \pm 0,01$) (Esatbeyoglu et al., 2023). (Corona et al., 2016). Encontraron que el valor del pH de las bebidas de frutas similares al kéfir de agua cambiaba entre 3,43 y 4,11. Además, (Ozcelik et al., 2021) informaron que los valores de pH de todas las bebidas de kéfir de agua producidas a partir de jugos de espino, cereza de cornalina, rosa mosqueta, ciruela roja y granada variaban de 3,45 a 3,97 al final de la fermentación.

Randazzo et al. También obtuvo resultados similares ($\text{pH} < 4$) para el kéfir de agua producido a partir de jugos de frutas mediterráneas. Además, estos autores indicaron que los valores de pH del kéfir de agua elaborado con jugo y puré de pera parecían ser ligeramente diferentes y esto se atribuyó a los diferentes niveles de contenido de cenizas y también a la producción de ácido láctico de diferentes cepas

de bacterias del ácido láctico durante el proceso de fermentación (Hampton et al., 2021).

En cuanto al pH (Destro et al., 2019a), evaluaron bebidas fermentada a partir de azúcar morena y pulpa de fruta, encontrándose que todas las formulaciones ensayadas mostraban diferencias significativas al final de la fermentación (56 h). A lo largo del tiempo, estos valores no difirieron estadísticamente de las 40 h de fermentación, excepto para el kéfir elaborado con azúcar convencional, en el que este valor se mantuvo desde las 48 h. El valor de pH más bajo para las diferentes bebidas se alcanzó a las 40 h, luego el pH se mantuvo constante. Al final de las 56 h la bebida con azúcar morena convencional tuvo el pH más bajo (3,71), seguida de azúcar morena convencional más pulpa de fruta (3,78), azúcar morena orgánica (3,91) y azúcar orgánica más pulpa de fruta (3,98).

(Laureys & De Vuyst, 2014), Informan en su estudio de fermentación de kéfir de agua, que el pH inicial fue de $4,85 \pm 0,01$ y alcanzó $3,45 \pm 0,01$, después de 72 h de fermentación. La tendencia decreciente de esta medida fue lenta hasta alcanzar el valor de $3,35 \pm 0,01$, después de 192 h de fermentación.

(Magalhaes et al., 2010), al usar como sustrato azúcar en la fermentación con gránulos de kéfir de agua en Brasil; obtuvieron valores de pH entre 5,6 y 4,1 para el tiempo de fermentación inicial (0 h) y final (24 h), respectivamente, valores también superiores a los reportados en la presente investigación.

Bebidas con pulpa de masa de coco (MC) fueron monitoreadas durante el período de fermentación con gránulos de kéfir de agua a las 48 y 72 h a 10 y 25 °C mediante la determinación de la acidez y pH (Puerari et al., 2012). El valor del pH disminuyó principalmente en las primeras 48 h y se registró un valor de pH de $3,8 \pm 0,04$ al final de la fermentación. Hubo una diferencia significativa entre el pH final a 10 °C ($4,00 \pm 0,50$ (48 h) $3,94 \pm 0,10$ (72 h) y 25 °C ($3,84 \pm 0,01$ (48 h) $3,80 \pm 0,04$ (72 h)).

La preparación al 2 % de sustratos a base de miel de abeja (MA), melaza de uva (MU), azúcar sin refinar (ANR) y azúcar normal (AN) como muestra control y activados con los granos de kéfir de agua (0,4 %), fueron sometidas a un proceso de fermentaron a 25 °C durante 48 horas con repeticiones durante 5 semanas (Çevik

et al., 2019). Los resultados del análisis de pH mostraron que el mayor desarrollo de acidez en las muestras de kéfir se observó en las muestras con miel de abeja y melaza. Sin embargo, este desarrollo no resultó suficiente, especialmente en azúcar; los alores en el caso de la melaza de uva durante el seguimiento arrojó en la primera semana un pH de 4.06 ± 0.06 y en la 5ta semana 3.94 ± 0.05 , el pH más bajo fue en miel de abeja 3.56 ± 0.16 .

La razón de esto es que se considera que los microorganismos en la microflora del kéfir prefieren nutrientes con azúcares naturales porque se ven afectados negativamente por los azúcares refinados y sin refinar (Silva et al., 2009). No obstante, los valores de pH (3,34-3,5) determinados en los estudios sobre kéfir de agua (Laureys & De Vuyst, 2017), se corresponden con los valores de pH del presente estudio.

(Sin et al., 2024) en su evaluación de parámetros físico químicos de la fermentación de los GKA observó que en general, el pH del kéfir de agua disminuyó mientras que el contenido de ácido láctico aumentó constantemente a medida que se prolongaba el tiempo de fermentación. Inicialmente, el pH de la solución de azúcar antes del inóculo era $5,16 \pm 0,01$. Este valor cayó a $4,43 \pm 0,08$ después de la inoculación de kéfir de agua (0 h). El pH alcanzó $3,79 \pm 0,00$ en las primeras 24 h y descendió gradualmente después de 48 h. El pH final del kéfir de agua (72 h) obtenido fue de $3,35 \pm 0,01$.

Es de notar que aunque no se tuvo en cuenta en el presente estudio, el incremento en el contenido de ácido láctico es concomitante con una disminución en los valores de pH. En el estudio de (Pendón et al., 2022), el ácido láctico en el kéfir de agua estaba entre 0,17 a 0,25 % pues cuanto mayor sea el tiempo de fermentación, mayor será la acidez y menores los valores de pH. Además, la naturaleza ácida de la miel final también contribuye a la acidez, produciendo así una solución de azúcar ácida como plantean algunos autores (Kongkaew et al., 2014). Una condición de crecimiento ácida puede favorecer el crecimiento de microorganismos tolerantes a los ácidos, pero el exceso de ácido podría deteriorar el crecimiento de los microorganismos (Laureys et al., 2019.,Laureys et al., 2022). De todos modos, los

resultados reportados están en el rango de (Laureys & De Vuyst, 2014) quienes reportaron un pH de 3,45 obtenido a las 72 h de fermentación. Los valores de pH se pueden variar dependiendo de las condiciones de fermentación, la cantidad de sustrato utilizado, el tipo de sustrato y la cantidad de granos de kéfir utilizados (Egea et al., 2022., Laureys et al., 2018., Lengkey & Balia, 2014).

Los valores medios de ° Brix obtenidos en las diferentes concentraciones de miel final de la presente investigación, reflejan en las concentraciones diferencias significativas ($p < 0,05$); 5 % ($2,27^a \pm 0,15$), 7 % ($2,76^b \pm 0,04$) y al 9 % ($3,53^c \pm 0,02$), valores que en general son inferiores a los reportados con el uso de otros sustratos. El análisis de sólidos solubles (° Brix) que realiza (Hidalgo Guerrero, 2023), refleja valores que van desde 5,67 °Brix (Azúcar morena y limón) a 5,00 °Brix (Azúcar morena y naranja). (López Rojo, 2016). Menciona que el % de sólidos solubles en la formulación del kéfir de agua en algunos productos de fermentación con tibicos está alrededor del 5,03 °Brix en dependencia del sustrato. (Monroy et al., 2016). En estudio fermentativo de la melaza con la utilización de gránulos de kéfir, establece una media de 6,68° Brix. (Monar et al., 2014). En la caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano con fermentación de 48 h reportó una media de 6,17° Brix. Con respecto a los sólidos solubles los autores establecen que este factor depende del sustrato utilizado ya que los microorganismos degradan los azúcares y por efecto la disminución del pH.

Antes de la fermentación (0 h), los valores Brix del sustrato de fermentación a base de orujo y jugo fueron $10,4 \pm 0,1$ y $11,8 \pm 0,5$, respectivamente. Después de la fermentación (72 h), hubo una reducción significativa ($p < 0,05$) en los valores Brix a $6,10 \pm 0,28$ para el orujo y $7,65 \pm 0,92$ para el jugo de aronia (Güzel-Seydim et al., 2023). Durante el proceso de fermentación, los azúcares se convirtieron en CO_2 y etanol y, por lo tanto, el contenido de azúcar de las bebidas de kéfir de agua elaboradas con orujo y jugo de aronia disminuyó al 42% y 31%, respectivamente (Esatbeyoglu et al., 2023). Se informaron resultados similares en estudios previos para bebidas similares al kéfir de agua (Randazzo et al., 2016).

Los valores de °Brix del kéfir de agua durante la fermentación de 72 h (Sin et al., 2024) en azúcar morena y el azúcar de palma como los principales sustratos, se redujeron de $7,37 \pm 0,12$ (0 h) a $5,83 \pm 0,06$, registraron una reducción del 22,26 %. La disminución de los valores de °Brix durante la fermentación se debe al metabolismo catalítico de la sacarosa en glucosa y fructosa, que es catalizado por la enzima invertasa de la levadura. Además, la reducción de los valores de °Brix también se correlacionó con la degradación de monosacáridos a ácidos orgánicos por bacterias del ácido láctico, como informaron (Destro et al., 2019a). (Gökırmaklı et al., 2023). Reportaron que los valores de °Brix de las bebidas de kéfir de agua pueden variar dependiendo del sustrato utilizado para la fermentación. Los valores de °Brix de las bebidas de kéfir de agua pueden variar entre 5,87 y 9,97; este rango no se corresponde con el encontrado en el presente estudio.

Al igual que los °Brix; los valores medios de los azúcares reductores (pol), obtenidos en las diferentes concentraciones de miel final de la presente investigación, reflejan diferencias significativas ($p < 0,05$); 5 % ($0,24^a \pm 0,01$), 7 % ($0,27^b \pm 0,01$) y al 9% ($0,30^c \pm 0,01$)

Para el estudio de los azúcares reductores (Hidalgo Guerrero, 2023), describe que existió diferencias significativas entre los 9 tratamientos utilizados, encontrando el mayor índice en Azúcar morena y naranja con un valor 6,73 y el más bajo en el sustrato a base de Panela y té negro con 3,89, estos azúcares reductores pueden reaccionar con otros alimentos evidenciando que la acción de aminoácidos provoca el cambio de color o sabor en la bebida. (Monar et al., 2014). Encontraron valores de azúcares reductores para la panela de 9,15 %. (Ávila et al., 2018). En su estudio sobre aprovechamiento del lactosuero para la elaboración de una bebida fermentada de bajo grado alcohólico, menciona valores de los azúcares reductores de $12,66 \pm 0,08$ (g/100 g). (López Rojo, 2016), En su investigación encontró que la concentración de azúcares disminuyó 1.71 % (de 5.03 a 3.32), 1.39 % (de 4.98 a 3.59) y 1.67% (de 4.52 a 2.85) para la piña, dátil y piloncillo, respectivamente.

CONCLUSIONES

- La sistematización de la información sobre el kéfir de agua permitió abordar su papel benéfico y sustratos utilizados en el proceso de fermentación, que condujo a la definición de la variable fundamental a evaluar en los ensayos.
- Se logra la activación y multiplicación del consorcio microbiano de los gránulos de Kéfir de agua en el laboratorio utilizando como sustrato la miel final de caña de azúcar y se definen los pasos y condiciones del proceso de fermentación.
- Los gránulos de Kéfir de agua inoculados a las tres concentraciones de miel final de caña de azúcar como sustrato evidenciaron una cinética de crecimiento y masa microbiana durante el proceso de fermentación similar, con tendencia a disminuir la masa a partir de los pases sucesivos de los gránulos. En ninguno de los casos existió diferencias significativas ($p \leq 0,05$), en los valores de pH al final de la fermentación, sugiriéndose optimizar la concentración del 7 %.
- La recopilación de la información orientada a la factibilidad de producir una bebida fermentada con gránulos de kéfir de agua empleando miel final de caña como sustrato muestra datos favorables y de sostenibilidad económica para la empresa.

RECOMENDACIONES

Evaluar en las siguientes investigaciones variables que pueden influir en la cinética del crecimiento de los GKA en sustrato de miel de caña de azúcar como son: pH del agua, temperatura y conductividad, así como la concentración óptima de inoculación de los gránulos de kéfir de agua y el comportamiento de la microbiota mediante ensayos de siembra en placa.

Valorar las posibles alternativas del uso del fermentado del kéfir de agua en la Empresa Agroindustrial azucarera Melanio Hernández Hernández.

Presentar un proyecto de investigación a la empresa para que se sustente las futuras investigaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, V., Scapini, T., Camargo, A. F., Bonatto, C., Stefanski, F. S., de Jesus, E. P., . . . Treichel, H. (2021). Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (*Cocos nucifera* L.) with inulin addition. *LWT*, 145, 111364.
- Arrieta-Echeverri, M. C., Fernandez, G. J., Duarte-Riveros, A., Correa-Álvarez, J., Bardales, J. A., Villanueva-Mejía, D. F., & Sierra-Zapata, L. (2023). Multi-omics characterization of the microbial populations and chemical space composition of a water kefir fermentation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10.
- Atapoğlu, C., Akbağ, H., Tölü, C., Das, G., Savas, T., & Yurtman, I. (2010). Effects of kefir as a probiotic source on the performance of goat kids. *South African Journal of Animal Science*, 40(4).
- Ávila, W. F. O., Ambriz, L. V. M., Aguilar, B. G. S., & Magaña, J. A. C. (2018). Aprovechamiento del lactosuero residual de empresas productoras de queso en la región norte de colima y sur de jalisco para la elaboración de una bebida fermentada de bajo grado alcohólico. *Revista Ra Ximhai*, 14(3), 37-48.
- Ayustaningwarno, F., Asikin, Y., Amano, R., Vu, N. T., Hajar-Azhari, S., Anjani, G., . . . Wada, K. (2023). Composition of minerals and volatile organic components of non-centrifugal cane sugars from Japan and ASEAN Countries. *Foods*, 12(7), 1406.
- Azi, F., Tu, C., Meng, L., Zhiyu, L., Cherinet, M. T., Ahmadullah, Z., & Dong, M. (2021). Metabolite dynamics and phytochemistry of a soy whey-based beverage bio-transformed by water kefir consortium. *Food Chemistry*, 342, 128225.
- Barillas-Figueroa, A. S. (2021). Cinética de reacción para la síntesis fermentativa de ácido láctico usando melaza de caña de azúcar mediante la utilización de *Lactobacillus leichmannii*. *Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Química Industrial. Universidad del Valle de Guatemala*.

- Bedoić, R., Ćosić, B., & Duić, N. (2019). Technical potential and geographic distribution of agricultural residues, co-products and by-products in the European Union. *Science of the Total Environment*, 686, 568-579.
- Bellut, K., Krogerus, K., & Arendt, E. K. (2019). Strains Isolated From Kombucha: Fundamental Insights, and Practical Application in Low Alcohol Beer Brewing.
- Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2019). Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), 686-700.
- Bueno, R. S., Ressutte, J. B., Hata, N. N., Henrique-Bana, F. C., Guergoletto, K. B., de Oliveira, A. G., & Spinosa, W. A. (2021). Quality and shelf life assessment of a new beverage produced from water kefir grains and red pitaya. *LWT*, 140, 110770.
- Cadena, D. P. A. (2022). Elaboración de bebidas artesanales con base en kéfir de agua con pulpas de frutas, macerados e infusiones y su aplicación a la coctelería de autor.
- Calatayud, M., Börner, R. A., Ghyselinck, J., Verstrepen, L., Medts, J. D., Abbeele, P. V. d., . . . Damak, S. (2021). Water kefir and derived pasteurized beverages modulate gut microbiota, intestinal permeability and cytokine production in vitro. *Nutrients*, 13(11), 3897.
- Capanoglu, E., Nemli, E., & Tomas-Barberan, F. (2022). Novel approaches in the valorization of agricultural wastes and their applications. *Journal of agricultural and food chemistry*, 70(23), 6787-6804.
- Caro Vélez, C., & León Peláez, A. (2015 Pamela). Antifungal capacity of cell-free supernatants obtained from fermentation of a substrate of brown sugar with water kefir grains. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 22-31.
- Cassanego, D. B., dos Santos Richards, N. S. P., Mazutti, M. A., & Ramírez-Castrillón, M. (2015). Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. *Ciência e Natura*, 37(5), 175-186.
- Cerda-Mejía, V., González-Suárez, E., Millán-Cruz, H., Ramos-Duchicela, J., & Pérez-Martínez, A. (2020). Estudio de viabilidad de la producción de miel de

- caña, diseño de procesos, aceptabilidad y análisis económico. *Tecnología Química*, 40(3), 517-533.
- Çevik, T., Aydoğdu, N. S., Özdemir, N., & Taş, T. K. (2019). The effect of different sugars on water kefir grains. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7, 40-45.
- Conadesuca. (2016). Comité Nacional para el Desarrollo Sostenible de la caña de Azúcar. México. Melazas de caña de azúcar y su uso en la fabricación de dietas para ganado. Nota informativa.
- Corona, O., Randazzo, W., Miceli, A., Guarcello, R., Francesca, N., Erten, H., . . . Settanni, L. (2016). Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 572-581.
- Côté, G. L., & Skory, C. D. (2012). Cloning, expression, and characterization of an insoluble glucan-producing glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1118. *Applied microbiology and biotechnology*, 93, 2387-2394.
- Cufaoglu, G., & Erdinc, A. N. (2023). An alternative source of probiotics: Water kefir. *Food Frontiers*, 4(1), 21-31.
- Cheirsilp, B., Shimizu, H., & Shioya, S. (2001). Modelling and optimization of environmental conditions for kefir production by *Lactobacillus kefirianofaciens*. *Applied microbiology and biotechnology*, 57, 639-646.
- Choi, W., Son, D. B., Hong, J., Jeong, D., Kim, H.-C., Lee, H., & Suh, J.-W. (2021). The effect of fermented kefir as functional feed additive in post-weaned pigs. *Fermentation*, 7(1), 23.
- da Anunciação, T. A., Guedes, J. D. S., Tavares, P. P. L. G., de Melo Borges, F. E., Ferreira, D. D., Costa, J. A. V., . . . Magalhães-Guedes, K. T. (2024). Biological Significance of Probiotic Microorganisms from Kefir and Kombucha: A Review. *Microorganisms*, 12(6), 1127.
- da Silva Araújo, C., Macedo, L. L., & Teixeira, L. J. Q. (2023). Evaluation of mid-infrared spectra associated with chemometrics for the determination of physicochemical properties during fermentation of a new strawberry-based beverage with water kefir grains. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105490.

- Darvishzadeh, P., Orsat, V., & Martinez, J. L. (2021). Process optimization for development of a novel water kefir drink with high antioxidant activity and potential probiotic properties from Russian olive fruit (*Elaeagnus angustifolia*). *Food and Bioprocess Technology*, 14, 248-260.
- Delgado, R., Mejías, E., Duarte-García, C., Fajo, A., Padrón, X., Pérez, O., . . . Lafarge, D. (2010). Empleo de la melaza de caña de azúcar como aditivo de galletas dulces. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 20(2), 13-16.
- Destro, T. M., Prates, D. d. F., Watanabe, L. S., Garcia, S., Biz, G., & Spinosa, W. A. (2019a). Organic brown sugar and jaboticaba pulp influence on water kefir fermentation. *Ciência e Agrotecnologia*, 43, e005619.
- Destro, T. M., Prates, D. d. F., Watanabe, L. S., Garcia, S., Biz, G., & Spinosa, W. A. (2019b). Organic brown sugar and jaboticaba pulp influence on water kefir fermentation. *Ciência e Agrotecnologia*, 43.
- Díaz Garcés, J., Díaz Garcés, V., Ulloa, M., & Taboada, J. (1988). Determinación de algunos parámetros para la producción doméstica de tibicos. *Rev. latinoam. microbiol*, 143-146.
- Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients*, 11(8), 1806.
- Egea, M. B., Santos, D. C. d., Oliveira Filho, J. G. d., Ores, J. d. C., Takeuchi, K. P., & Lemes, A. C. (2022). A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health benefits. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(6), 1536-1552.
- Esatbeyoglu, T., Fischer, A., Legler, A. D., Oner, M. E., Wolken, H. F., Köpsel, M., . . . Ozogul, F. (2023). Physical, chemical, and sensory properties of water kefir produced from Aronia melanocarpa juice and pomace. *Food Chemistry: X*, 18, 100683.
- Farinas, C. S. (2015). Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 179-188.

- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate polymers*, 189, 296-303.
- Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., de Souza Vandenberghe, L. P., & Soccol, C. R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review. *Food Microbiology*, 66, 86-95.
- Gabriela Galarza-Heredia, L., Alain Mendoza-Rivadeneira, F., & Xavier Barcia-Anchundia, J. (2023). Efecto del producto fermentativo de Tibicos de Kéfir como acidificante natural suministrado en el agua de bebida a pollos de engorde Cobb 500. *Revista Científica de la Facultade de Veterinaria*, 33(1).
- Gaden Jr, E. L. (1959). Fermentation process kinetics. *Journal of biochemical and microbiological technology and engineering*, 1(4), 413-429.
- Gamba, R. R., Yamamoto, S., Sasaki, T., Michihata, T., Mahmoud, A.-H., Koyanagi, T., & Enomoto, T. (2019). Microbiological and functional characterization of kefir grown in different sugar solutions. *Food Science and Technology Research*, 25(2), 303-312.
- Gangnat, I. D., & Kreuzer, M. (2021). Water kefir for weaned piglets: A pilot study on its farm-scale production, its palatability and its effects on growth performance. *JSFA Reports*, 1(1), 11-16.
- Gao, W., Zhang, L., Feng, Z., Liu, H., Shigwedha, N., Han, X., . . . Zhang, S. (2015). Microbial diversity and stability during primary cultivation and subcultivation processes of Tibetan kefir. *International journal of food science & technology*, 50(6), 1468-1476.
- Gervasi, T., & Mandalari, G. (2024). Valorization of Agro-Industrial Orange Peel By-Products through Fermentation Strategies. *Fermentation*, 10(5), 224.
- Gökırmaklı, Ç., Erol, Z., Gun, I., Ozmen, O., & Guzel-Seydim, Z. B. (2023). Prophylaxis effects of water kefir on post-infectious irritable bowel syndrome in rat model. *International journal of food science & technology*, 58(6), 3371-3378.

- Gupta, V. K., Rajendraprasad, S., Ozkan, M., Ramachandran, D., Ahmad, S., Bakken, J. S., . . . Zec, S. (2024). Safety, feasibility, and impact on the gut microbiome of kefir administration in critically ill adults. *BMC medicine*, 22(1), 80.
- Güzel-Seydim, Z. B., Şatır, G., & Gökırmaklı, Ç. (2023). Use of mandarin and persimmon fruits in water kefir fermentation. *Food Science & Nutrition*, 11(10), 5890-5897.
- Hampton, J., Tang, C., Jayasree Subhash, A., & Serventi, L. (2021). Assessment of pear juice and puree as a fermentation matrix for water kefir. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(3), e15223.
- Haryati, T., Susanti, T., & Susana, I. (2015). Nutritional value of rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingredient for broiler chickens. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(2), 231.
- Hernández-García, J. E., Rodríguez-Díaz, J. A., Gómez-Valdivia, L. Y., & Leal-Blanco, M. A. (2021). Crecimiento de cepas de *Lactobacillus* sp aisladas de intestino de abejas en medios alternativos. VI Conferencia Científica Internacional, Trinidad, del 13 al 16 de octubre de 2021. Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez”.
- Hernández-García, J. E., Rodríguez-Fernández, J. C., Hernández-Cueva, J., González-Socarrás, B., & Kociubinski, G. (2024). Efecto del Kéfir de agua sobre indicadores bioproductivo en cerdos en cría y preceba // *Encuentro de Soberanía Alimentaria y Desarrollo Agropecuario y Forestal Sostenible, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Sancti Spíritus José Martí Pérez. 21 de mayo de 2024.*
- Hidalgo Guerrero, R. A. (2023). Evaluación del kéfir de agua con tres sustratos edulcorantes y tres saborizantes naturales.
- Jaffé, W. R. (2015). Nutritional and functional components of non centrifugal cane sugar: a compilation of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 194-202.

- Jaime, C. E. F., Ramos, G. G., & Sancho, R. A. S. (2022). Propriedades do fermentado kefir de água em diferentes substratos alimentares. *Revista Perspectiva*, 46(6), 69-83.
- Kimmel, S. A., Roberts, R. F., & Ziegler, G. R. (1998). Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 659-664.
- Koh, W. Y., Lim, X. X., Khor, B. H., Rasti, B., Tan, T. C., Kobun, R., & Uthumporn, U. (2024). Production and Optimisation of Fermented Pumpkin-Based Mature Coconut Water Kefir Beverage Using Response Surface Methodology. *Beverages*, 10(2), 34.
- Koh, W. Y., Utra, U., Rosma, A., Effarizah, M. E., Rosli, W. I. W., & Park, Y.-H. (2018). Development of a novel fermented pumpkin-based beverage inoculated with water kefir grains: a response surface methodology approach. *Food science and biotechnology*, 27, 525-535.
- Kongkaew, S., Chaijan, M., & Riebroy, S. (2014). Some characteristics and antioxidant activity of commercial sugars produced in Thailand. *Current Applied Science and Technology*, 14(1), 1-9.
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2018). Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiology*, 73, 351-361.
- 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, 2876.
- 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). The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), 719-732.

- Laureys, D., Leroy, F., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2022). Backslopping time, rinsing of the grains during backslopping, and incubation temperature influence the water kefir fermentation process. *Frontiers in Microbiology*, 13, 871550.
- Ledesma, N. A. (2022). *Usos y propiedades del yacón (Smallanthus sonchifolius) como alimento funcional y posible empleo como sustrato para fermentar kefir de agua*. Universidad Nacional de La Plata.
- Lengkey, H., & Balia, R. (2014). The effect of starter dosage and fermentation time on pH and lactic acid production. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 30(2), 339-347.
- Linares-Bravo, P., Cabo-Araoz, S. D., Luna-Solano, G., Urrea-Garcia, G. R., & Cantú-Lozano, D. (2022). Obtention of New Edible Biofilms from Water Kefir Grains in Comparison with Conventional Biofilms from Taro (*Colocasia esculenta*) and Cassava (*Manihot esculenta*) Starch. *Processes*, 10(9), 1804.
- López-Rojo, J., García-Pinilla, S., Hernández-Sánchez, H., & Cornejo-Mazón, M. (2017). Estudio de la fermentación de kéfir de agua de piña con tibicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(2), 405-414.
- López Rojo, J. P. (2016). Efecto de la formulación del kéfir de agua en algunos productos de fermentación con tibicos.
- Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2021). An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *International Journal of Food Microbiology*, 345, 109128.
- Magalhaes, K. T., de M. Pereira, G., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2010). Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1241-1250.
- Marinho, C. O., Marangoni Júnior, L., Cecci, R. R. R., & Vieira, R. P. (2023). Blends of chitosan and water kefir grain biomass incorporated with nanosilica. *Coatings*, 13(2), 465.
- Martínez-Torres, A., Gutiérrez-Ambrocio, S., Heredia-del-Orbe, P., Villa-Tanaca, L., & Hernández-Rodríguez, C. (2017). Inferring the role of microorganisms in

- water kefir fermentations. *International journal of food science & technology*, 52(2), 559-571.
- Minari, G. D., Piazza, R. D., Sass, D. C., & Contiero, J. (2024). EPS Production by *Lactobacillus casei* Using Glycerol, Glucose, and Molasses as Carbon Sources. *Microorganisms*, 12(6), 1159.
- Missotten, J. A., Michiels, J., Degroote, J., & De Smet, S. (2015). Fermented liquid feed for pigs: an ancient technique for the future. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 1-9.
- Mohamed, D. E., Alian, A. M., & Mohamed, R. M. (2024). Optimization of production and evaluation of Microbial kojic Acid obtained from Sugarcane Molasses (SCM) by *Aspergillus* sp. *Food systems*, 7(1), 71-76.
- Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., & Ramírez-Cárdenas, L. (2014). Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 6(1).
- Monroy, A., Lechón, G., & Méjía, D. (2016). Evaluación del kéfir de agua (tibicos) en sustratos de melaza y panela para la producción de etanol". . <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/44828/capitulo3.pdf?sequence=1&isAllo>
wed=y#:~:text=Se%20determina%20que%20el%20pH,la%20teor%C3%ADa%20de%20Gonzales%2C%20S".
- Moretti, A. F., Moure, M. C., Quiñoy, F., Esposito, F., Simonelli, N., Medrano, M., & León-Peláez, Á. (2022). Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods*, 5, 100123.
- Nastar Marcillo, D. A. (2022). *Producción de una bebida funcional a partir de mezclas de suero de leche de cabra y jugos de frutos andinos, fermentadas con gránulos de kéfir*.
- NRA-1:07. (2007). Norma Ramal Miel B. Especificaciones Obligatoria.
- Ossa, J. A., Vanegas, M. C., & Badillo, Á. M. (2010). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 13(1), 97-104.

- ÖZBAY, G., SEMİNT, S., & TÜYSÜZ, V. (2024). A Research on Geographical Molasses. *ANATOLIA SOCIAL RESEARCH JOURNAL*, 3(1), 5-16.
- Ozcelik, F., Akan, E., & Kinik, O. (2021). Use of Cornelian cherry, hawthorn, red plum, roseship and pomegranate juices in the production of water kefir beverages. *Food Bioscience*, 42, 101219.
- Paredes, J. L., Escudero-Gilete, M. L., & Vicario, I. M. (2022). A new functional kefir fermented beverage obtained from fruit and vegetable juice: Development and characterization. *LWT*, 154, 112728.
- Pendón, M. D., Bengoa, A. A., Iraporda, C., Medrano, M., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2022). Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. *Journal of applied microbiology*, 133(1), 162-180.
- Perez-Sanfiel, F., & F., F.-Á. (2006). Manual de Métodos Analítico para el Control Unificado: Azucar Crudo. Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras. Sala Nacional de Control y Análisis. MINAZ.
- Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*, 48(2), 634-640.
- Randazzo, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germanà, M. A., Erten, H., . . . Settanni, L. (2016). Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology*, 54, 40-51.
- Rodrigues, K., Araújo, T., Schneedorf, J., Ferreira, C. d. S., Moraes, G. d. O., Coimbra, R., & Rodrigues, M. (2016). A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. *J Funct Foods*. 2016; 21: 58-69.
- Sabate, D. C., Cruz, M., Benítez-Ahrendts, M., & Audisio, M. C. (2012). Beneficial effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Mori2, a honey-associated strain, on honeybee colony performance. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 39-46.

- Şafak, H., Gün, İ., Tudor Kalit, M., & Kalit, S. (2023). Physico-Chemical, Microbiological and Sensory Properties of Water Kefir Drinks Produced from Demineralized Whey and Dimrit and Shiraz Grape Varieties. *Foods*, 12(9), 1851.
- Santos, R., Assis, R., Freitas, R., Barbosa, I., & Ceccatto, V. (2024). Sugarcane Rapadura: Characteristics of the Oldest Historical Energy Food and Its Native Production Method. *Processes*, 12(3), 511.
- Santos, S. A. d., Barbosa, G. M., Bernardes, P. C., Carneiro, J. C. S., Tostes, M. d. G. V., & Coelho, J. M. (2023). Probiotification of whole grape juice by water kefir microorganisms. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 66, e23210475.
- Sharma, I., & Yaiphathoi, S. (2020). Role of microbial communities in traditionally fermented foods and beverages in North East India *Recent Advancements in Microbial Diversity* (pp. 445-470): Elsevier.
- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X., & Lima, Á. S. (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Applied biochemistry and biotechnology*, 152, 316-325.
- Sin, P. Y., Tan, S. H., Asras, M. F. F., Lee, C. M., & Lee, T. C. (2024). Probiotic Growth Pattern and Physicochemical Evaluation of Water Kefir Fermentation. *Malaysian Applied Biology*, 53(2), 21-30.
- Souza, U. S., & Silva, M. R. d. (2017). Avaliação de pH, acidez titulável e crescimento de massa colônica de grãos de kefir de água inoculados em extrato hidrossolúvel de arroz (*Oryza sativa*). *Hig. aliment*, 143-148.
- Suasnávar-Ardón, M. J. (2022). Evaluación de la fermentación de melaza de caña de azúcar empleando bacterias lácticas para la producción de ácido láctico. Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional presentado para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial. Universidad del Valle de Guatemala.
- Suksawang, S., Cheirsilp, B., & Yeesang, J. (2016). Production of kefir from molasses and spent yeast cells by *Lactobacillus kefirifaciens* JCM 6985. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 21(2), 59-67.

- Supriya, R., Sravathi, V., Polaju Deepa, D. K., Vasavi, D. K. D., & Tripathi, P. (2023). Application of fermentation technology in poultry feed for the sustainable poultry industry: A review.
- Tarek, A., Zabut, B. M., & Al-Krenawie, A. I. (2017). Effect of kefir intake on growth performance and some biochemical profiles among domestic rabbits. *World J Pharm Pharm Sci*, 6(3), 223-240.
- Tavares, P. P. L. G., Mamona, C. T. P., Nascimento, R. Q., dos Anjos, E. A., de Souza, C. O., Almeida, R. C. d. C., . . . Magalhães-Guedes, K. T. (2023). Non-Conventional Sucrose-Based Substrates: Development of Non-Dairy Kefir Beverages with Probiotic Potential. *Fermentation*, 9(4), 384.
- Tirado Vera, J. W., & Zambrano Loor, M. M. (2021). *Efectos físicoquímicos, microbiológicos y organolépticos del kéfir y biocompuestos de hierba luisa (Cymbopogon citratus) y chaya (Cnidoscopus chayamansa) en una bebida*. Calceta: ESPAM MFL.
- Troya, M. G. T., Delgado, I. R., & Ochoa, L. S. (2021). Efecto del kéfir de agua sobre la concentración de vibrios en juveniles de *Penaeus vannamei* Boone, 1931. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura.*, 3(3), 113-123.
- Valenti, F., Porto, S. M., Selvaggi, R., & Pecorino, B. (2020). Co-digestion of by-products and agricultural residues: A bioeconomy perspective for a Mediterranean feedstock mixture. *Science of the Total Environment*, 700, 134440.
- Velázquez-Quiñones, S. E., Moreno-Jiménez, M. R., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Álvarez, S. A., Rosales-Villarreal, M. C., . . . Rocha-Guzmán, N. E. (2021). Apple Tepache fermented with tibicos: Changes in chemical profiles, antioxidant activity and inhibition of digestive enzymes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(7), e15597.
- Vera Mejía, R., Sánchez Miranda, L., Zambrano Gavilares, P., & Rodríguez Perdomo, Y. (2021). Obtención de un candidato a probiótico de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC a partir de un medio de cultivo natural con materias primas agroindustriales. *Revista de Salud Animal*, 43(3).

- Vidra, A., Tóth, A. J., & Németh, Á. (2017). Lactic acid production from cane molasses. *Waste Treatment and Recovery*, 2(1), 13-16.
- Villarreal-Morales, S. L., Montañez-Saenz, J. C., Aguilar-González, C. N., & Rodriguez-Herrera, R. (2018). Metagenomics of traditional beverages *Advances in Biotechnology for Food Industry* (pp. 301-326): Elsevier.
- Waldherr, F. W., Doll, V. M., Meißner, D., & Vogel, R. F. (2010). Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiology*, 27(5), 672-678.
- Zannini, E., Lynch, K. M., Nyhan, L., Sahin, A. W., O'Riordan, P., Luk, D., & Arendt, E. K. (2022). Influence of substrate on the fermentation characteristics and culture-dependent microbial composition of water kefir. *Fermentation*, 9(1), 28.
- Zohri, A.-N. A., Mahmoud, G. A.-E., Saddek, N. H., & Hanafy, R. A. (2018). Optimization of kojic acid production conditions from cane molasses using Plackett-Burman design. *European Journal of Biological Research*, 8(2), 56-69.