

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**T E S I S**

**"MICROBIOTA DEL KÉFIR DE AGUA ARTESANAL SEGÚN EL TIPO DE  
SUSTRATO Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN"**

Para optar el Título Profesional de:

**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Presentado por la Bachiller:

**JHÉNIFER CERQUÍN HUARIPATA**

Asesores:

**ING. M. SC. FANNY LUCILA RIMARACHÍN CHÁVEZ**

**MBA. ING. MARY DIANA HERRERA CHILÓN**


**CAJAMARCA-PERÚ**

**2026**

## CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador:  
Jhénifer Cerquín Huaripata  
DNI: N° 71468072  
Escuela Profesional/Unidad UNC:  
**INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**
2. Asesor:  
**Ing. M. Sc. Fanny Lucila Rimarachín Chávez**  
Facultad/Unidad UNC:  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**
3. Grado académico o título profesional  
 Bachiller     Título profesional     Segunda especialidad  
 Maestro     Doctor
4. Tipo de Investigación:  
 Tesis     Trabajo de investigación     Trabajo de suficiencia profesional  
 Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación:  
**"MICROBIOTA DEL KÉFIR DE AGUA ARTESANAL SEGÚN EL TIPO DE  
SUSTRATO Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN"**
6. Fecha de evaluación: 25/03/2026
7. Software antiplagio:  TURNITIN     URKUND (ORIGINAL) (\*)
8. Porcentaje de Informe de Similitud: 20%
9. Código Documento: oid:::3117:571421110
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:  
 APROBADO     PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

Fecha Emisión: 26/03/2026

|   |
|---|
| <i>Firma y/o Sello<br/>Emisor Constancia</i>  |
|  |
| <b>Ing. M. Sc. Fanny Lucila Rimarachín Chávez</b><br><b>DNI:40028465</b>            |

\* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**  
"NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA"  
Fundada por Ley N° 14015, del 13 de febrero de 1962  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
Secretaría Académica



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

En la ciudad de Cajamarca, a los doce días del mes de marzo del año dos mil veintiséis, se reunieron en el ambiente 2H - 204 de la Facultad de Ciencias Agrarias, los miembros del Jurado, designados según **Resolución de Consejo de Facultad N° 038-2026-FCA-UNC, de fecha 12 de enero del 2026**, con la finalidad de evaluar la sustentación de la **TESIS** titulada: "**MICROBIOTA DEL KÉFIR DE AGUA ARTESANAL SEGÚN EL TIPO DE SUSTRATO Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN**", realizada por la Bachiller **JHÉNIFER CERQUÍN HUARIPATA** para optar el Título Profesional de **INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**.

A las nueve horas y siete minutos, de acuerdo a lo establecido en el **Reglamento Interno para la Obtención de Título Profesional de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca**, el Presidente del Jurado dio por iniciado el Acto de Sustentación, luego de concluida la exposición, los miembros del Jurado procedieron a la formulación de preguntas y posterior deliberación. Acto seguido, el Presidente del Jurado anunció la aprobación por unanimidad, con el calificativo de dieciséis ( 16 ); por tanto, la Bachiller queda expedita para proceder con los trámites que conlleven a la obtención del Título Profesional de **INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**.

A las diez horas y veinticinco minutos del mismo día, el Presidente del Jurado dio por concluido el Acto de Sustentación.

Dr. Jimmy Frank Oblitas Cruz  
PRESIDENTE

Ing. Mtr. Max Edwin Sangay Terrones  
SECRETARIO

Dr. José Gerardo Sahuana Granados  
VOCAL

Ing. M. Sc. Fanny Lucila Rimarachín Chávez  
ASESORA

MBA. Ing. Mary Diana Herrera Chilón  
ASESORA

## DEDICATORIA

Dedico este logro primero a Dios, quien me sostuvo con su amor infinito en los momentos más difíciles y me dio fortaleza para no desistir y seguir adelante con determinación. Su presencia constante ha sido mi guía y apoyo en este camino para alcanzar uno de mis sueños más anhelados.

A mí mismo, este logro es un homenaje a mi propia perseverancia, por cada noche sin dormir y cada lagrima derramada en silencio, y aun así encontrar la determinación para seguir adelante.

A mis queridos padres, Adolfo Cerquín Alcántara y María Teresa Huaripata Díaz, les dedico este logro con todo mi corazón. Su amor incondicional ha sido mi refugio seguro en medio de la tormenta. Reconozco y valoro sus sacrificios silenciosos, por creer en mí cuando yo misma dudaba, y por enseñarme que con fe y esfuerzo todo es posible.

A mis hermanos Luis Adrián Cerquín Huaripata y Brian Smith Cerquín Huaripata, quienes con su apoyo y amor incondicional me hicieron sentir acompañada y me dieron la fuerza para seguir adelante. Ustedes fueron mi alegría y mi sostén para superar obstáculos y alcanzar mis metas.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco primero a Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de este largo camino; su amor incondicional me sostuvo en los momentos de incertidumbre y me iluminó cuando las dificultades parecían insuperables.

Agradezco profundamente a mis padres Adolfo Cerquín Alcántara y María Teresa Huaripata Diaz, por ser un ejemplo constante de esfuerzo y humildad a lo largo de mi vida. Su apoyo permanente me motivó a no rendirme nunca y a seguir mis objetivos con firmeza y dedicación.

A mis hermanos Luis Adrián Cerquín Huaripata y Brian Smith Cerquín Huaripata por estar siempre cerca y brindarme su apoyo absoluto. Ustedes son un motivo más para seguir adelante.

A la Universidad Nacional de Cajamarca, Facultad de Ciencias Agrarias y la Escuela Académico Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias, además de ser un lugar de aprendizaje académico encontré amistades que duraran para toda la vida.

A mis docentes por compartir sus conocimientos y orientar mi aprendizaje durante todo el proceso de formación académico.

A mis asesores Ing. M. Sc. Fanny Lucila Rimarachín Chávez y Mba. Ing. Mary Diana Herrera Chilón, por su apoyo, paciencia, guía y conocimientos. Me enseñaron la importancia de la seriedad, la responsabilidad y el rigor académico, valores fundamentales para completar mi formación como investigador.

## INDICE GENERAL

|   |            |
|---|------------|
| <b>DEDICATORIA .....</b>                    | <b>iv</b>  |
| <b>AGRADECIMIENTO .....</b>                 | <b>v</b>   |
| <b>INDICE GENERAL .....</b>                 | <b>vi</b>  |
| <b>INDICE DE TABLAS.....</b>                | <b>ix</b>  |
| <b>INDICE DE FIGURAS.....</b>               | <b>x</b>   |
| <b>RESUMEN.....</b>                         | <b>xi</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                       | <b>xii</b> |
| <br>  |            |
| <b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>                | <b>1</b>   |
| 1.1. Descripción del problema .....         | 2          |
| 1.2. Formulación del problema .....         | 3          |
| 1.3. Justificación .....                    | 3          |
| 1.3.1. Justificación Teórico .....          | 3          |
| 1.3.2. Justificación Práctico.....          | 4          |
| 1.3.3. Justificación Social.....            | 4          |
| 1.4. Objetivos.....                         | 5          |
| 1.4.1. Objetivo general.....                | 5          |
| 1.4.2. Objetivos específicos.....           | 5          |
| 1.5. Hipótesis .....                        | 5          |
| <br>  |            |
| <b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>      | <b>6</b>   |
| 2.1. Antecedentes de la investigación ..... | 6          |
| 2.1.1. A Nivel Internacional .....          | 6          |
| 2.1.2. A Nivel Nacional.....                | 8          |
| 2.2. Marco teórico .....                    | 11         |
| 2.2.1. Kéfir de Agua.....                   | 11         |
| 2.2.2. Microbiología del Kéfir de Agua..... | 12         |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 2.2.3.      | Ecuaciones Estequiométricas de la Fermentación del Kéfir de Agua..... | 14        |
| 2.2.4.      | Factores que Afectan la Fermentación del Kéfir de Agua.....           | 18        |
| 2.2.5.      | Chancaca.....   | 20        |
| 2.2.6.      | Oca.....  | 21        |
| 2.2.7.      | Importancia de la Caracterización Microbiológica.....                 | 25        |
| 2.2.8.      | Aplicaciones del Kéfir de Agua.....                                   | 26        |
| 2.3.        | Definición de términos.....   | 27        |
| 2.3.1.      | Kéfir de Agua.....  | 27        |
| 2.3.2.      | Fermentación.....   | 27        |
| 2.3.3.      | Microorganismos.....  | 27        |
| 2.3.4.      | Bacterias Ácido-Lácticas.....   | 28        |
| 2.3.5.      | Bacterias Acido-Acéticas.....   | 28        |
| 2.3.6.      | Levaduras.....  | 28        |
| 2.3.7.      | Tiempo de Fermentación.....   | 28        |
| 2.3.8.      | Sustratos.....  | 29        |
| 2.3.9.      | Chancaca.....   | 29        |
| 2.3.10.     | Probióticos.....  | 29        |
| 2.3.11.     | Oca.....  | 29        |
| <b>III.</b> | <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                      | <b>30</b> |
| 3.1.        | Ubicación Geográfica.....   | 30        |
| 3.2.        | Materiales y equipos.....   | 31        |
| 3.2.1.      | Materias Primas e Insumos.....  | 31        |
| 3.2.2.      | Solución y Agares.....  | 31        |
| 3.2.3.      | Materiales y Equipos de Laboratorio.....                              | 32        |
| 3.2.4.      | Otros Materiales.....   | 33        |
| 3.3.        | Metodología.....  | 34        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.3.1. Variables .....  | 34         |
| 3.3.2. Niveles y tratamientos de estudio .....  | 34         |
| 3.3.3. Diseño Experimental, Arreglos de los Tratamientos .....  | 34         |
| 3.3.4. Procedimiento .....  | 36         |
| <b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>  | <b>59</b>  |
| 4.1. Análisis de Varianza para Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....  | 61         |
| 4.2. Análisis de Varianza para Levaduras .....  | 66         |
| 4.3. Análisis de Varianza para Bacterias Ácido Acéticas (BAA).....  | 71         |
| 4.4. Comportamiento de °Brix y pH durante la fermentación .....   | 76         |
| <b>V. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>82</b>  |
| <b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>84</b>  |
| <b>VIII. ANEXOS .....</b>   | <b>100</b> |
| Anexo A: Matriz de Operacionalización de las Variables.....   | 100        |
| Anexo B: Panel fotográfico .....  | 101        |
| Anexo B1: Disolución de la chancaca.....  | 101        |
| Anexo B2: Preparación de la oca amarilla (Oxalis tuberosas) .....   | 102        |
| Anexo B3: Elaboración del kéfir de agua artesanal .....   | 103        |
| Anexo B4: Análisis microbiológico .....   | 104        |
| Anexo C: Resultados de la medición de °Brix y pH .....  | 105        |
| Anexo C1: Medición de grados Brix y pH del Kéfir de agua con sustrato de chancaca<br>.....                              | 105        |
| Anexo C2: Medición de grados Brix y pH del Kéfir de agua con sustrato de oca<br>amarilla.....                           | 105        |
| Anexo D: Resultados microbiológicos de bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido-<br>acéticas y levaduras (UFC/mL)..... | 106        |

**INDICE DE TABLAS**

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1 <i>Factores, variables (independientes), niveles y tratamientos en estudio</i> ..... | 34 |
| Tabla 2 <i>Condiciones de incubación para cuenta en placa de diferentes grupos</i> .....     | 50 |
| Tabla 3 <i>Condiciones de incubación para cuenta en placa de diferentes grupos</i> .....     | 53 |
| Tabla 4 <i>Análisis de varianza para bacterias ácido lácticas</i> .....                      | 61 |
| Tabla 5 <i>Análisis de varianza para Levaduras</i> .....                                     | 66 |
| Tabla 6 <i>Análisis de varianza para las bacterias ácido acéticas</i> .....                  | 71 |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 <i>Mapa de ubicación – E.A.P. Ing. Industrias Alimentarias y laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas (UNC – Cajamarca)</i> ..... | 30 |
| Figura 2 <i>Diseño experimental</i> .....   | 35 |
| Figura 3 <i>Diagrama de flujo para la disolución de la chancaca</i> .....   | 38 |
| Figura 4 <i>Diagrama de flujo del sustrato oca amarilla (Oxalis tuberosa)</i> .....   | 41 |
| Figura 5 <i>Diagrama de bloques de la elaboración del Kéfir de agua artesanal</i> .....   | 45 |
| Figura 6 <i>Preparación y dilución de muestras para sus análisis microbiológicos</i> .....  | 48 |
| Figura 7 <i>Determinación de Bacterias Ácido Lácticas en el Kéfir de Agua</i> .....   | 51 |
| Figura 8 <i>Determinación de Bacterias Ácido Acéticas en el Kéfir de Agua</i> .....   | 54 |
| Figura 9 <i>Determinación de Levaduras en el Kéfir de Agua</i> .....  | 58 |
| Figura 10 <i>Recuento de UFC/mL de BAL en muestras de kéfir de agua en función del tipo de sustrato.</i> .....                                      | 63 |
| Figura 11 <i>Crecimiento de la población de BAL en función del tiempo.</i> .....  | 64 |
| Figura 12 <i>Recuento de UFC/mL de levaduras en muestras de kéfir de agua en función del tipo de sustrato.</i> .....                                | 68 |
| Figura 13 <i>Crecimiento de la población de levaduras en función del tiempo.</i> .....  | 69 |
| Figura 14 <i>Recuento de UFC/mL de BAA en muestras de kéfir de agua en función del tipo de sustrato.</i> .....                                      | 72 |
| Figura 15 <i>Crecimiento de la población de BAA en función del tiempo.</i> .....  | 73 |
| Figura 16 <i>Cambio de los grados Brix a lo largo del tiempo (horas).</i> .....   | 76 |
| Figura 17 <i>Cambio del pH a lo largo del tiempo (horas).</i> .....   | 77 |

## RESUMEN

El kéfir de agua es una bebida fermentada con propiedades probióticas cuya composición microbiana varía según el tipo de sustrato y el tiempo de fermentación. Esta investigación tuvo como objetivo determinar la cantidad de bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA) y levaduras en el kéfir de agua artesanal elaborado con chancaca y oca amarilla (*Oxalis tuberosa*) como sustratos locales de Cajamarca, además evaluados a 24, 48 y 72 horas de fermentación, mediante un diseño completamente al azar con estructura factorial  $2 \times 3$  y tres repeticiones, realizando análisis microbiológicos mediante recuento en placa con medios selectivos (agar MRS para BAL, agar MA/YGCE para BAA y agar Saboraud para levaduras). Resultados: el tipo de sustrato tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre las BAL, mientras que el tiempo de fermentación ( $p > 0.05$ ) y la interacción entre ambos factores ( $p > 0.05$ ) no fueron significativos, por otra parte, la oca amarilla promovió un mayor crecimiento de BAL, con un promedio superior a  $2.0 \times 10^5$  UFC/mL, frente a un promedio superior a  $2.0 \times 10^4$  UFC/mL de la chancaca. Para las levaduras, tanto el sustrato como el tiempo de fermentación fueron significativos ( $p < 0.05$ ), mientras que la interacción de ambos factores no tuvo efecto significativo ( $p > 0.05$ ); asimismo, la oca amarilla registró un promedio superior a  $5.0 \times 10^4$  UFC/mL, frente a un promedio superior a  $2.0 \times 10^4$  UFC/mL de la chancaca. El tipo de sustrato, el tiempo de fermentación y la interacción entre los dos factores no tuvieron un efecto significativo ( $p > 0.05$ ) sobre las BAA. Los parámetros fisicoquímicos disminuyeron progresivamente: en chancaca el pH varió de 4.80 a 3.39 y los °Brix de 8 a 6.67; en oca amarilla el pH disminuyó de 5.72 a 3.83 y los °Brix de 8 a 5.27. Se concluye que el kéfir de agua elaborado con oca amarilla presenta mayor contenido de microorganismos probióticos, particularmente BAL y levaduras, posicionándolo como una alternativa viable para el desarrollo de bebidas funcionales con recursos andinos.

**Palabras clave:** kéfir de agua, microorganismos, fermentación, bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas, levadura, sustratos, chancaca, oca amarilla, probióticos.

## ABSTRACT

Water kefir is a fermented beverage with probiotic properties whose microbial composition varies according to substrate type and fermentation time. This research aimed to determine the quantity of lactic acid bacteria (LAB), acetic acid bacteria (AAB), and yeasts in artisanal water kefir made with chancaca and yellow oca (*Oxalis tuberosa*) as local substrates from Cajamarca, evaluated at 24, 48, and 72 hours of fermentation, using a completely randomized design with a 2×3 factorial structure and three replications, performing microbiological analyses through plate counting with selective media (MRS agar for LAB, MA/YGCE agar for AAB, and Saboraud agar for yeasts). Results: the type of substrate had a significant effect ( $p < 0.05$ ) on LAB, while fermentation time ( $p > 0.05$ ) and the interaction between both factors ( $p > 0.05$ ) were not significant; furthermore, yellow oca promoted greater LAB growth, with an average above  $2.0 \times 10^5$  CFU/mL, compared to an average above  $2.0 \times 10^4$  CFU/mL for chancaca. For yeasts, both substrate and fermentation time were significant ( $p < 0.05$ ), while the interaction between both factors had no significant effect ( $p > 0.05$ ); likewise, yellow oca recorded an average exceeding  $5.0 \times 10^4$  CFU/mL, compared to an average above  $2.0 \times 10^4$  CFU/mL for chancaca. The type of substrate, fermentation time, and the interaction between the two factors had no significant effect ( $p > 0.05$ ) on AAB. Physicochemical parameters decreased progressively: in chancaca pH ranged from 4.80 to 3.39 and °Brix from 8 to 6.67; in yellow oca pH decreased from 5.72 to 3.83 and °Brix from 8 to 5.27. It is concluded that water kefir made with yellow oca presents a higher content of probiotic microorganisms, particularly LAB and yeasts, positioning it as a viable alternative for the development of functional beverages using andean resources.

**Keywords:** water kefir, microorganisms, fermentation, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, yeast, substrates, chancaca, yellow oca, probiotics.

## I. INTRODUCCIÓN

El kéfir de agua es una bebida fermentada que se elabora a partir de un líquido azucarado inoculado con granos que contienen microorganismos probióticos, como las bacterias lácticas y levaduras, cuyo proceso de fermentación puede ser optimizado mediante la adecuada selección de sustratos. Su composición microbiológica puede variar según los sustratos utilizados y el tiempo de fermentación, lo que influye en su calidad y funcionalidad (Vargas & Ruiz, 2024).

Para analizar su contenido microbiológico, se emplean metodologías de laboratorio que posibilitan la identificación y cuantificación de la diversidad de microorganismos presentes en esta bebida fermentada. Entre las técnicas más utilizadas, se encuentra el cultivo en placa, donde se emplea un medio específico para estimular el crecimiento de los distintos microorganismos presentes en el kéfir. Las colonias resultantes pueden ser identificadas visualmente por sus características morfológicas y luego examinadas microscópicamente para determinar su estructura (Cia, 2024).

Los probióticos son microorganismos vivos no patógenos como *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus*, y *Bifidobacterium*, equilibran el microbiota intestinal al ser ingeridos. Su acción, a menudo en mezclas de diversas especies, inhibe el crecimiento de patógenos mediante la competencia por nutrientes esenciales durante la fermentación, siendo las especies de *Lactobacillus* ampliamente usadas en la industria alimentaria. (Arias Santos, 2024)

Los microorganismos más comunes en el kéfir de agua tenemos a las bacterias ácido-lácticas. (BAL) como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus spp.* (*L. fusant*, *L. reuteri*, *L. kunkeei*) (Limbad et al, 2024), *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.* y *Bifidobacterium spp.* (Dikmetas et al, 2024); bacterias ácido-acéticas (BAA) como *Acetobacter spp.* (*A. aceti*, *A. lovaniensis*, *A. pasteurianus*); y levaduras como

*Candida spp.* (*C. kefir*, *C. guilliermondii*, *C. colliculosa*), *Rhodotorula mucilaginosa*, y *Saccharomyces cerevisiae*, (Limbad et al, 2024), esta última, junto con *S. boulardii*, está demostrada que previene diversos tipos de diarrea y colitis en humanos. (Monar et al, 2014).

Conocer el contenido microbiológico del kéfir de agua es importante para comprender los efectos probióticos, establecer criterios de calidad en su elaboración, permitiendo su investigación y desarrollo de nuevas aplicaciones basadas en sus microorganismos, además de ser beneficiosos para la salud, lo que en su conjunto impulsa la calidad, seguridad y potencial medicinal de esta bebida fermentada (Teijeiro et al., 2025).

Además, los pacientes con síndrome del intestino irritable (SII) buscan los beneficios de los probióticos en lácteos, pero la intolerancia ha impulsado a la búsqueda de alternativas (Vargas & Ruiz, 2024), como el kéfir de agua, un producto sin lactosa, artesanal o industrial, con ingredientes accesible y económico.

A pesar de su potencial, en Cajamarca no existen estudios que evalúen el efecto de sustratos como la chancaca y los tubérculos cultivados en la zona como por ejemplo la oca amarilla en la población microbiana del kéfir de agua. Por ello, este estudio ha buscado identificar los principales microorganismos presentes en esta bebida fermentada, empleando ambos sustratos a diferentes tiempos de fermentación, determinando su influencia en su composición microbiana.

### **1.1. Descripción del problema**

La microbiota del kéfir de agua está compuesta por bacterias ácido-lácticas (BAL), bacterias ácido-acéticas (BAA) y levaduras (Waldherr et al.,2010), estos microorganismos dependen de la región y del país de origen, incluso dentro de un mismo país la microbiota del kéfir de agua varía según la región donde se cultive (Miguel et al.,2011).

En Cajamarca, la oca es un tubérculo nativo importante en la cultura y alimentación de la región, y la chancaca, derivado de la caña de azúcar, otro recurso tradicional muy presente en la zona; sin embargo, hasta ahora no se conoce cómo se comportan los microorganismos en el kéfir de agua artesanal cuando se elabora con estos dos sustratos, que son muy diferentes entre sí, dado que el sustrato y el tiempo de fermentación son factores clave que pueden influir directamente en la composición microbiana de la bebida.

Por lo tanto, esta investigación es necesario para conocer la microbiota del kéfir de agua producido en la provincia de Cajamarca usando sustratos locales bajo diferentes tiempos de fermentación, con el fin de valorar los productos autóctonos de región.

## **1.2. Formulación del problema**

¿Cuál es la cantidad de bacterias ácido-lácticas totales, bacterias ácido-acéticas totales y levaduras totales en el kéfir de agua artesanal en función del tipo de sustrato y el tiempo de fermentación?

## **1.3. Justificación**

### ***1.3.1. Justificación Teórico***

La composición microbiana de los granos de kéfir de agua es similar a la del kéfir de leche (Lynch et al., 2021), por otro lado, la composición microbiológica de la bebida tiene diferencias con el kéfir de leche, al tener una mayor proporción de levaduras fermentativas. Con el desarrollo de esta investigación, se buscó aportar datos relevantes sobre el efecto de las variables de tipos de sustratos y tiempos de fermentación en la producción de kéfir de agua. En este estudio se realizó la caracterización de los componentes microbiológicos del kéfir de agua y se exploró alternativas para su producción a nivel artesanal; identificando la composición microbiana con propiedades probióticas, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS)

y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas ( $10^6$ - $10^8$  UFC/g ó  $>10^8$ -  $10^{10}$  UFC/dosis de células viables); ofrecen beneficios para la salud al mejorar el equilibrio de la flora intestinal y fortalecer el sistema inmunológico (Sánchez et al., 2015). Esta investigación contribuye al conocimiento científico sobre la microbiota presente en bebidas fermentadas no lácteas, enriqueciendo la comprensión de los procesos fermentativos probióticos y proporcionan una base teórica para futuras investigaciones en alimentos funcionales.

### ***1.3.2. Justificación Práctico***

Se estableció un flujo de procesos replicable para futuras investigaciones y producción industrial a baja escala, siendo un modelo práctico para los productores artesanales de la ciudad de Cajamarca. Este enfoque facilitó la caracterización microbiológica detallada del kéfir de agua y permitió explorar alternativas para su producción a nivel artesanal, identificando las etapas críticas del proceso de fermentación. Además, la metodología desarrollada optimiza variables como el tipo de sustrato y el tiempo de fermentación para obtener un producto con las concentraciones probióticas adecuadas. Este estudio contribuye a generar información científica aplicable a la mejora de procesos fermentativos en bebidas probióticas no lácteas.

### ***1.3.3. Justificación Social***

La presente investigación representa una oportunidad para los productores artesanales de la ciudad de Cajamarca, ya que se proporciona un modelo práctico y accesible para la elaboración de kéfir de agua. Este producto puede constituirse en una alternativa de negocio viable para pequeños emprendedores que buscan incursionar en el mercado de alimentos

funcionales y bebidas saludables. Además, al ser una bebida probiótica no láctea, representa una opción nutritiva para personas con intolerancia a la lactosa o que siguen dietas alternativas.

## **1.4. Objetivos**

### ***1.4.1. Objetivo general***

Determinar la cantidad de bacterias ácido-lácticas totales, bacterias ácido-acéticas totales y levaduras totales en el kéfir de agua artesanal en función del tipo de sustrato y tiempo de fermentación.

### ***1.4.2. Objetivos específicos***

- Determinar la microbiota de bacterias ácido-lácticas totales del kéfir de agua artesanal en función del tipo de sustrato y tiempo de fermentación.
- Determinar la microbiota de bacterias ácido-acéticas totales del kéfir de agua artesanal en función del tipo de sustrato y tiempo de fermentación.
- Determinar la microbiota de levaduras totales del kéfir de agua artesanal en función del tipo de sustrato y tiempo de fermentación.

## **1.5. Hipótesis**

La microbiota del kéfir de agua artesanal varía significativamente en función del tipo de sustrato y el tiempo de fermentación

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Antecedentes de la investigación

#### 2.1.1. A Nivel Internacional

En la investigación de Cia (2024), en su estudio titulado *“Formulación y Análisis de la Composición de Bebidas Realizadas a Base de Kéfir de Agua”*, investigó la influencia de diferentes tipos de endulzantes sobre las características químicas, microbiológicas y nutricionales de las bebidas de kéfir de agua. Se elaboraron tres variantes de bebidas utilizando miel de abejas, azúcar mascabo y azúcar blanca como endulzantes. Las variantes fueron analizadas en términos de propiedades químicas, microbiológicas y nutricionales. Durante el proceso de fermentación, se evaluaron parámetros fisicoquímicos y se realizaron análisis microbiológicos para determinar la presencia de bacterias ácido lácticas y levaduras. Los resultados indicaron que la bebida preparada con azúcar mascabo presentó un mayor consumo de azúcares a lo largo del tiempo, con diferencias significativas en la presencia de bacterias ácido lácticas y levaduras en función del tipo de endulzante utilizado. Se concluyó que el tipo de endulzante tiene un impacto significativo en las características químicas, microbiológicas y nutricionales del kéfir de agua. Este antecedente es relevante, indicando la importancia del sustrato y su influencia en la población de microorganismos en el kéfir de agua artesanal.

En otro estudio, Hidalgo (2023), en su investigación titulada *“Evaluación del Kéfir de Agua con Tres Sustratos y Saborizantes Naturales”*, analizó el uso de tres edulcorantes (azúcar blanca, morena y panela) y tres saborizantes naturales (limón, té negro y naranja) en la elaboración del kéfir de agua. A partir de estas combinaciones, se obtuvieron nueve variantes que fueron sometidas a análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales. Se evaluaron parámetros como pH, grados Brix, acidez y recuentos microbiológicos. Los resultados mostraron

un contenido promedio de 0.95% de alcohol etílico, un pH de 3.87, y concentraciones de bacterias ácido lácticas de  $4.6 \times 10^8$  UFC/ml y levaduras de  $3.7 \times 10^8$  UFC/ml. La variante elaborada con miel de abeja, tras un período de 48 horas de fermentación, fue la más valorada en términos sensoriales. Este antecedente respalda la hipótesis de que el tipo de sustrato y el tiempo de fermentación influyen en la composición microbiológica del kéfir de agua artesanal.

Por su parte, Pedraza y Ramírez (2019), en su estudio titulada ***“Caracterización fisicoquímica, sensorial y micológica del kéfir de agua en jugos de frutas tropicales”***, se enfocaron en determinar las características fisicoquímicas, sensoriales y el crecimiento de hongos en kéfir de agua fermentado en jugos de frutas tropicales, como jugo de pera y maracuyá, combinados con agua y panela. Se observó la presencia de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygosaccharomyces spp.*, así como bacterias ácido lácticas dominantes. Este estudio sugiere que los sustratos empleados influyen considerablemente en la calidad y aceptabilidad del producto final. Con base a este planteamiento y resultados, el presente estudio selecciona estas especies para evaluar su viabilidad y concentración bajo diferentes sustratos y tiempos de fermentación.

Rodríguez et al. (2023), en su estudio titulado ***“Microbiological and Chemical Characterization of Water Kefir: An Innovative Source of Potential Probiotics for Bee Nutrition”***, realizaron una caracterización microbiana y química del kéfir de agua con el objetivo de determinar su potencial como bebida probiótica. A lo largo de un año, se recolectaron muestras mensuales de kéfir de agua y se analizaron para identificar variaciones en la cantidad y tipo de microorganismos presentes, así como su actividad antimicrobiana. Los resultados demostraron la presencia de una diversidad de especies bacterianas y levaduras, cuya composición varió con el tiempo. Algunas cepas exhibieron actividad antimicrobiana

significativa, lo que posiciona al kéfir de agua como una alternativa innovadora a las bebidas probióticas tradicionales, con aplicaciones potenciales en la nutrición de abejas y otros campos. Este antecedente justifica la importancia de evaluar la viabilidad de bacterias lácticas y levaduras en función del tiempo de fermentación.

### **2.1.2. A Nivel Nacional**

En el ámbito nacional, Rodas (2019), en su estudio titulado ***“Efecto del porcentaje de gránulos de kéfir y temperatura de incubación en la elaboración de una bebida funcional”***, evaluó el efecto del porcentaje de gránulos de kéfir (5%, 10% y 15%) y la temperatura de incubación (20°C, 25°C y 30°C) en las características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas de la bebida. Los resultados mostraron que un aumento en el porcentaje de gránulos y la temperatura de incubación redujo el pH, mientras que incrementó los recuentos de levaduras. No se detectaron coliformes ni hongos, asegurando que las condiciones higiénicas fueron adecuadas. En la evaluación sensorial, se observó variabilidad en las preferencias de los panelistas, lo que destaca la influencia de estos factores en las características de la bebida. Este antecedente permite discutir las condiciones de fermentación pueden favorecer ciertas especies microbianas en el kéfir de agua artesanal.

Choque et al. (2019), en su estudio titulado ***“Proyecto de bebida fermentada natural Biokef”***, analizaron el impacto de una bebida fermentada a base de kéfir como alternativa para mejorar la salud digestiva, especialmente en personas con problemas de indigestión o estreñimiento. El estudio se centró en el aprovechamiento de los microorganismos del kéfir, compuestos principalmente por bacterias y levaduras que fermentan agua, y la implementación de prácticas de higiene durante el proceso de fermentación. Además, se realizó un estudio de mercado en diversos distritos de Lima para evaluar la aceptación de las bebidas fermentadas. Los

resultados indicaron que las bebidas fermentadas fueron bien aceptadas por los consumidores, lo que valida el valor nutricional de estas bebidas y su potencial en el desarrollo de productos funcionales para la salud intestinal. Este antecedente aporta información sobre la viabilidad de los microorganismos y la importancia del control de condiciones de fermentación.

Guerrero y Oblitas (2024) en su estudio titulado “***Producción de sustancias antioxidantes en bebidas fermentadas y su comparación con la producción de bebidas kefiradas. Una revisión***”, investigaron cómo distintos sustratos (agua de coco, infusión de hierbas y jugo de frutas) y tiempos de fermentación (24, 48 y 72 horas) afectan las propiedades antioxidantes y la composición microbiológica del kéfir de agua. Los resultados indicaron que el uso de jugo de frutas como sustrato y un tiempo de fermentación de 48 horas optimizan la actividad antioxidante y promueven un equilibrio favorable de bacterias ácido-lácticas y levaduras. Este antecedente sugiere que la selección del sustrato y la duración de la fermentación son factores determinantes en las propiedades funcionales y microbiológicas del kéfir de agua artesanal.

Ramirez Huaman, 2020 en su estudio titulado “***Actividad metabólica, viabilidad y exopolisacáridos de bacterias lácticas de granos de kéfir liofilizado con potencial tecnológico en la región central***”, evaluó cómo diferentes crioprotectores (goma de tara, CMC y maltodextrina) y sus concentraciones (0,20% y 0,50%) afectan la actividad metabólica, viabilidad y producción de exopolisacáridos de las bacterias lácticas presentes en los granos de kéfir liofilizados. Los resultados mostraron que el tipo y la concentración del crioprotector influyen significativamente en la actividad metabólica y viabilidad de las bacterias lácticas, así como en la producción de exopolisacáridos. Este antecedente sugiere que la selección adecuada

de crioprotectores es crucial para mantener las propiedades funcionales y microbiológicas del kéfir de agua artesanal.

Moretti et al. (2022) publicaron una revisión en la revista *Future Foods* sobre el kéfir de agua, abarcando desde sus orígenes históricos hasta los retos de llevarlo a una producción industrial regulada. En ella destacan que su composición microbiana incluye BAL, BAA y levaduras conviviendo de forma simbiótica en los gránulos, y que esta diversidad varía considerablemente según el sustrato utilizado, algo que se relaciona directamente con la presente investigación. Con respecto a los sustratos, señalan que los gránulos tienen una gran capacidad de adaptarse a distintas fuentes de carbohidratos, además, mencionando explícitamente a la chancaca como uno de los sustratos empleados en Perú, lo que respalda su uso en este estudio. En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, indican que el pH disminuye progresivamente con el tiempo de fermentación y que los °Brix se reducen conforme los microorganismos consumen los azúcares disponibles. Finalmente, en esta investigación concluye que se necesita más estudios que caractericen el kéfir elaborado con sustratos locales, lo que refuerza la pertinencia de este trabajo.

## **2.2. Marco teórico**

### **2.2.1. Kéfir de Agua**

#### **a. Definición y Características Generales.**

El kéfir de agua es una bebida fermentada elaborada a partir de la fermentación de una solución de agua con azúcar, utilizando gránulos de kéfir como inóculo. Estos gránulos están compuestos por una matriz de polisacáridos conocida como kefiran, en la que coexisten microorganismos como bacterias ácido-lácticas (BAL), levaduras y, en menor proporción, bacterias ácido-acéticas (Pihurov et al., 2021). A diferencia del kéfir de leche, el kéfir de agua se fermenta en un medio no lácteo, lo que lo convierte en una alternativa apta para personas con intolerancia a la lactosa o que prefieren opciones veganas.

Históricamente, el consumo de kéfir de agua ha sido documentado en comunidades del Cáucaso, Asia Central y Europa Oriental, donde se le atribuían propiedades medicinales, como la mejora del sistema digestivo y el fortalecimiento del sistema inmunológico (Taype, 2023). Su composición microbiológica le confiere efectos probióticos que pueden contribuir a la salud intestinal y a la prevención de enfermedades gastrointestinales (da Anunciação et al., 2024).

En los últimos años, la popularidad del kéfir de agua ha crecido significativamente debido a su contenido probiótico, su bajo aporte calórico y su versatilidad en la preparación. Se puede elaborar con distintos tipos de azúcares y sustratos como frutas deshidratadas, jugos naturales o infusiones de hierbas, lo que permite obtener una diversidad de perfiles sensoriales y nutricionales (Pizard, 2022). Además, su proceso de fermentación genera compuestos beneficiosos como ácidos orgánicos, enzimas digestivas y pequeñas cantidades de etanol y dióxido de carbono, que contribuyen a su sabor ligeramente efervescente y refrescante. (Bozkir et al., 2024)

Dado su potencial funcional y su creciente aceptación como bebida saludable, el kéfir de agua ha sido objeto de múltiples estudios orientados a evaluar sus propiedades nutricionales, microbiológicas y beneficios para la salud, y la diversidad de microorganismos presentes en la fermentación varía según el tipo de sustrato utilizado, el tiempo de fermentación y las condiciones ambientales, lo que abre un campo de investigación en torno a su optimización y estandarización para la producción a escala comercial (Castañeda et al., 2023).

### ***2.2.2. Microbiología del Kéfir de Agua***

El kéfir de agua es una bebida fermentada que alberga una comunidad microbiana diversa, conformada principalmente por bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras, y estos microorganismos coexisten en una relación simbiótica dentro de una matriz de polisacáridos, lo que facilita la fermentación y la producción de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud humana (Epsetin y Velasco, 2020)

La fermentación del kéfir de agua es iniciada por las levaduras presentes en los gránulos, principalmente del género *Saccharomyces*, las cuales descomponen los azúcares en compuestos fermentables como etanol y CO<sub>2</sub>; a partir de estos subproductos, las bacterias ácido lácticas inician su actividad metabólica, produciendo ácido láctico y generando la caída del pH característica del proceso (Tingirikari et al., 2024). Esta secuencia metabólica coordinada entre levaduras y BAL es fundamental para el desarrollo de la fermentación y la calidad final de la bebida (Bozkir et al., 2024).

#### **a. Bacterias Ácido – Lácticas.**

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son esenciales en la fermentación del kéfir de agua, ya que transforman los azúcares en ácido láctico, contribuyendo a la disminución del pH y a la conservación del producto, y entre las especies más comunes se encuentran:

- *Lactobacillus kefiranofaciens*: Principal productora del polisacárido kefiran, que aporta estabilidad estructural a los gránulos y mejora la textura del kéfir.
- *Lactobacillus paracasei*: Responsable de la fermentación de carbohidratos y la producción de ácido láctico y otros compuestos antimicrobianos.
- *Leuconostoc mesenteroides*: Produce exopolisacáridos, que influyen en la viscosidad del kéfir y pueden modular la fermentación (Fernández, 2022).

Estas bacterias no solo favorecen a la estabilidad del kéfir de agua, sino que también promueven la salud intestinal al actuar como probióticos, ayudando en la digestión y fortaleciendo la microbiota intestinal (Rodríguez et al., 2023).

#### **b. Bacterias Ácido – Acéticas.**

Las bacterias de ácido-acéticas (BAA) son un componente importante de la microbiota de los granos de kéfir de agua, donde se encuentran en una concentración de  $10^6$  -  $10^7$  UFC por gramo de grano (Lynch et al., 2021). Se ha reconocido al género *Acetobacter* como la más común de las bacterias ácido-acéticas presentes en el kéfir de agua.

Su actividad de estas bacterias, influenciada por la disponibilidad de oxígeno, es fundamental en la determinación de las concentraciones finales de ácido acético y etanol en la bebida fermentada (Vargas y Ruiz, 2024).

#### **c. Levaduras.**

Las levaduras desempeñan un papel clave en la fermentación del kéfir de agua, generando etanol y dióxido de carbono, lo que proporciona efervescencia a la bebida, y entre las especies más destacadas se encuentran *Saccharomyces cerevisiae*, responsable de la producción de etanol y compuestos aromáticos que influyen en el sabor del kéfir, y *Candida kefir*, que contribuye a la degradación de azúcares y a la formación de metabolitos bioactivos que mejoran

las propiedades funcionales del kéfir (Montero, 2021). Otras levaduras frecuentemente identificadas en el kéfir de agua incluyen *Dekkera bruxellensis*, *Lachancea fermentati*, *Kluyveromyces marxianus* y *Kazachstania turicensis*. *Saccharomyces cerevisiae* y las especies del género *Kluyveromyces* son consideradas parte de la microbiota esencial, ya que exhiben un mayor crecimiento y actividad fermentativa en distintos estudios (Tingirikari et al., 2024). Además, *Dekkera bruxellensis* ha sido reportada como un componente frecuente en el kéfir de agua artesanal, contribuyendo al perfil aromático de la bebida (Laureys et al., 2019).

Estas levaduras también pueden modular la actividad de las bacterias ácido-lácticas al producir vitaminas y aminoácidos esenciales para su crecimiento, fortaleciendo así la simbiosis microbiana (Castellanos, 2020)

#### **d. Interacción Simbiótica entre Bacterias y Levaduras.**

El kéfir de agua se diferencia de otras bebidas fermentadas por la relación simbiótica entre sus microorganismos, ya que mientras las levaduras descomponen los azúcares en compuestos fermentables, las bacterias ácido-lácticas utilizan estos subproductos para generar ácidos orgánicos y exopolisacáridos, favoreciendo el equilibrio microbiano del kéfir, y esta interacción no solo impacta la fermentación, sino que también influye en la calidad sensorial y en las propiedades funcionales del kéfir de agua (Rodríguez et al., 2023).

#### **2.2.3. Ecuaciones Estequiométricas de la Fermentación del Kéfir de Agua**

La fermentación es un proceso metabólico mediante el cual los microorganismos obtienen energía a partir de la degradación de azúcares en ausencia de oxígeno. Todo proceso fermentativo parte de la glucólisis, una ruta metabólica universal en la que una molécula de glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) es degradada en dos moléculas de piruvato, generando 2 moléculas de ATP y 2 moléculas de NADH. A partir del piruvato, cada tipo de microorganismo sigue una ruta

metabólica distinta según sus enzimas y condiciones ambientales, dando lugar a productos finales diferentes (Marcia Palma & Malespín Rocha, 2013).

**a. Hidrólisis de la sacarosa: etapa previa obligatoria.**

El sustrato principal del kéfir de agua es la sacarosa, es por ello, que antes de ser fermentada por los distintos grupos microbianos, debe ser hidrolizada a sus monosacáridos constituyentes mediante la acción de la enzima invertasa ( $\beta$ -fructosidasa), producida principalmente por las levaduras del consorcio. Laureys y De Vuyst (2014) documentaron que el sustrato mayoritario, la sacarosa, fue completamente convertido tras las primeras 24 horas de fermentación, lo que coincidió con la producción de la mayor parte del polisacárido del grano de kéfir de agua. La ecuación que describe esta etapa inicial es:



La glucosa y la fructosa liberadas no siguen rutas metabólicas equivalentes, mientras que la glucosa entra preferentemente a la glucólisis o a la biosíntesis de dextrano, asimismo, la fructosa puede ser metabolizada por las BAL heterofermentativas o reducida a manitol como mecanismo de reoxidación de cofactores.

**b. Fermentación Láctica - Bacterias Ácido Lácticas (BAL).**

Las BAL pueden seguir dos rutas metabólicas para degradar la glucosa, dependiendo de las enzimas que posean:

- **Fermentación homoláctica:** las BAL homofermentativas presentes en el kéfir de agua, incluyendo *Lactocaseibacillus paracasei* y *Liquorilactobacillus nagelii*, catabolizan la glucosa exclusivamente a través de la glucólisis (Vía Embden-Meyerhof-Parnas, EMP), produciendo lactato como único producto final orgánico. Fiorda et al. (2017) señala que las BAL homofermentativas utilizan la vía EMP para la generación de energía, con

reciclaje del  $\text{NAD}^+$  mediante la reducción del piruvato a lactato. La ecuación estequiométrica global de esta reacción es la siguiente:



El rendimiento energético de la fermentación homoláctica es de 2 moles de ATP por mol de glucosa, lo que la convierte en la ruta metabólica más eficiente entre todas las que emplean los microorganismos del kéfir, ya que aprovecha al máximo la energía disponible durante el proceso. En ese sentido, Laureys y De Vuyst (2014) señalan que el ácido láctico fue uno de los dos metabolitos principales de la fermentación, y que la mayor parte de su producción ocurrió durante las primeras 72 horas, período en el cual el pH descendió de 4,26 a 3,45, reflejando claramente la actividad metabólica de los microorganismos a lo largo del tiempo.

- **Fermentación heteroláctica:** En la fermentación heteroláctica, característica de *Leuconostoc mesenteroides*, la glucosa es procesada mediante la vía de las pentosas fosfato, en lugar de la vía EMP. En esta ruta, la glucosa se descompone en xilulosa-5-fosfato, a partir del cual se generan simultáneamente ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. La producción de  $\text{CO}_2$  es consecuencia de una descarboxilación que ocurre en la vía, y el etanol se forma cuando el acetaldehído generado acepta los electrones del NADH. A diferencia de la fermentación homoláctica, en esta ruta solo se obtiene 1 ATP por molécula de glucosa (Parra Huertas, 2010):



(*Glucosa*  $\rightarrow$  *Ácido láctico* + *Etanol* + *Dióxido de carbono* + *Energía*)

En ambos casos, la producción de ácido láctico genera una disminución del pH del medio, lo que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y contribuye a la conservación de la bebida (Parra Huertas, 2010).

### **c. Fermentación Alcohólica — Levaduras**

Las levaduras del kéfir de agua, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* y *Dekkera bruxellensis*, también degradan la glucosa por la vía EMP, pero derivan el piruvato hacia la producción de etanol y CO<sub>2</sub> en lugar de lactato. Esto confiere a la bebida su carácter efervescente y levemente alcohólico. Laureys y De Vuyst (2014) reportaron que el metabolismo de las levaduras prevaleció sobre el de las bacterias ácido-lácticas a pesar de que estas últimas estaban numéricamente presentes en mayor cantidad, siendo el etanol el metabolito mayoritario de toda la fermentación. La reacción global es:



*(Glucosa → 2 Etanol + 2 Dióxido de carbono + Energía)*

Esta reacción ocurre en dos subpasos enzimáticos: primero, el piruvato se descarboxila a acetaldehído y CO<sub>2</sub> gracias a la enzima piruvato descarboxilasa (PDC), y luego ese acetaldehído se reduce a etanol mediante la reoxidación del NADH, reacción catalizada por el alcohol deshidrogenasa (ADH), lo que explica tanto la efervescencia característica del kéfir de agua, ya que el CO<sub>2</sub> producido queda disuelto en la bebida, como el leve contenido alcohólico del producto final. Además, el etanol generado no solo queda en la bebida, sino que también sirve como sustrato para las bacterias ácido acéticas presentes en el kéfir, que lo utilizan para continuar con su propio metabolismo (Tingirikari et al., 2024).

Por otra parte, Fiorda et al. (2017) destacan que la estimulación del metabolismo de *Saccharomyces* en el kéfir azucarado favorece también el crecimiento de las bacterias ácido-acéticas, que se benefician del etanol producido para su propio metabolismo oxidativo.

#### **d. Fermentación acética – Bacterias Ácido Acéticas (BAA)**

A diferencia de las BAL y las levaduras, las BAA no realizan fermentación propiamente dicha, sino una oxidación aerobia. Las BAA toman el etanol producido por las levaduras como sustrato y lo oxidan a ácido acético en presencia de oxígeno. Este proceso ocurre en dos etapas consecutivas: primero el etanol es oxidado a acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa, y luego el acetaldehído es oxidado a ácido acético por la enzima aldehído deshidrogenasa. Ambas reacciones requieren la transferencia de electrones al oxígeno, lo que explica por qué este proceso solo puede ocurrir en presencia de oxígeno y por qué las BAA son microorganismos estrictamente aerobios (Lynch et al., 2021). La ecuación global es:



*(Etanol + Oxígeno → Ácido acético + Agua)*

La producción de ácido acético por las BAA contribuye al perfil de sabor del kéfir de agua, aportando notas ácidas características, y su concentración final en la bebida depende directamente de la disponibilidad de oxígeno durante la fermentación y de la cantidad de etanol producido por las levaduras (Lynch et al., 2021; Bozkir et al., 2024).

#### **2.2.4. Factores que Afectan la Fermentación del Kéfir de Agua**

La fermentación del kéfir de agua es un proceso dinámico que depende de diversos factores físicos, químicos y microbiológicos, los cuales influyen en la composición microbiana, la producción de metabolitos y la estabilidad del producto final.

### **a. Tiempo de Fermentación.**

El tiempo de fermentación juega un papel fundamental en la evolución de los microorganismos dentro del kéfir de agua, ya que a medida que avanza el proceso cambian la concentración de bacterias y levaduras, así como los niveles de ácido-láctico, etanol y compuestos aromáticos.

- ***Fermentación corta (12-24 horas)***: Se observa una rápida acidificación del medio y una alta actividad de las bacterias ácido-láctico (BAL), lo que contribuye a la seguridad microbiológica del kéfir (Navia y Pazmiño, 2015).
- ***Fermentación intermedia (24-48 horas)***: Se incrementa la producción de compuestos volátiles y etanol, lo que modifica el perfil organoléptico del kéfir (Blanco, 2016).
- ***Fermentación prolongada (+48 horas)***: Se intensifica la producción de ácidos y alcoholes, lo que puede afectar la aceptación sensorial del producto (Saboya et al., 2024).

### **b. Tipo de sustrato.**

Los sustratos utilizados en la fermentación afectan la disponibilidad de nutrientes para las bacterias y levaduras, influyendo en la tasa de fermentación y en la producción de metabolitos.

- ***Chancaca***: Al ser un azúcar no refinado, aporta minerales y compuestos bioactivos que pueden potenciar la actividad de los microorganismos y mejorar las propiedades funcionales del kéfir (Grández Armas, 2003).
- ***Sustratos alternativos***: La miel, los jarabes de frutas y los extractos vegetales pueden enriquecer el kéfir con antioxidantes y compuestos fenólicos, mejorando sus beneficios para la salud (Ledesma, 2022).

### 2.2.5. *Chancaca*

#### a. **Definición.**

Los azúcares simples como el azúcar de caña y la panela son los sustratos más comúnmente utilizados en la preparación del kéfir de agua. Estos azúcares son fácilmente metabolizados por las bacterias y levaduras, lo que promueve una fermentación eficiente (Ambrocio, 2018). Sin embargo, en esta investigación se introduce el uso de chancaca como alternativas innovadoras.

La chancaca, un azúcar no refinado derivado de la caña de azúcar, contiene una mayor cantidad de nutrientes debido a su procesamiento mínimo. La FAO (1994), reconoce la chancaca como azúcar no centrifugada y recibe diversos nombres, se le conoce como Gur en la India y Pakistán, raspadura en Brasil y Ecuador, chancaca en el Perú, Panela en Colombia, papelón en México, Guatemala y otros países de Centroamérica (Grández Armas, 2003).

#### b. **Tipos de Chancaca.**

- ***Chancaca granulada:*** es una variante de la panela o chancaca convencional presentada en forma de gránulos o polvo, en contraste con su forma sólida tradicional. Proviene de la clarificación, evaporación y concentración del jugo de caña de azúcar.
- ***Chancaca en bloque:*** la chancaca se presenta en bloques sólidos de diversas formas y pesos entre 0.5 y 1.5 kg, adecuándose a la producción y mercado específico. Su valor nutricional es más alto que el del azúcar blanco al preservar la mayoría de los minerales y vitaminas naturales de la caña durante su elaboración. (Carrillo Rios, 2014)
- ***Chancaca en pastillas:*** este tipo de chancaca o panela es un producto completamente natural, sin aditivos ni colorantes sintéticos, perfecto para diversas aplicaciones en bebidas, cócteles, platos y postres (Peralvo, 2014).

### **c. Propiedades Fisicoquímicas y Nutritivas de la Chancaca.**

La chancaca retiene una variedad de componentes beneficiosos como carbohidratos, minerales como fósforo (33,03%), calcio (65,62%), y hierro (2,17), vitaminas A, B, C, D y E, proteínas y compuestos fenólicos característicos de la caña de azúcar. La chancaca está compuesta por 82% sacarosa, 15% fructosa, 2% agua, minerales, vitaminas, proteínas (Obando, 2010).

La sacarosa es el componente más importante, representando entre 73 y 90%, seguido de azúcares reductores (4-14%) que son mitad glucosa, mitad fructosa. Su composición nutricional incluye niveles de humedad (1,37%), proteínas (0,49%), extracto etéreo (0,07%), cenizas (0,77%), fibra insoluble (0,00%), y azúcares totales (97,30%) (Carrillo Rios, 2014).

### **d. Beneficios de la Chancaca.**

El consumo de chancaca o panela, provee la energía necesaria para los procesos metabólicos y aporta nutrientes esenciales que fortalecen la inmunidad, a diferencia del azúcar refinado. Además de prevenir enfermedades del sistema respiratorio y urinario, fortalece los huesos, combate la osteoporosis, y protege contra la caries dental gracias a su contenido de fósforo, calcio y cationes alcalinos como potasio, magnesio y calcio que contrarrestan la acidez perjudicial. La chancaca también regula el ritmo cardíaco, la excitabilidad nerviosa, y contribuye a tratar condiciones como la anemia, raquitismo y osteomalacia. (Villanueva C. y Soria T., 2022)

## **2.2.6. Oca**

### **a. Definición.**

La oca (*Oxalis tuberosa*) es un tubérculo andino perteneciente a la familia Oxalidaceae, cultivado principalmente en regiones altoandinas del Perú, Bolivia y otros países sudamericanos, donde constituye un alimento fundamental en la dieta tradicional, desarrollándose en zonas

ubicadas entre los 2,800 y 4,000 m s.n.m., con buena adaptación a climas fríos y suelos de adecuado drenaje, siendo apreciada no solo por su sabor ligeramente ácido y dulce tras la exposición al sol, sino también por su resistencia y facilidad de conservación, lo que la convierte en un cultivo de gran importancia para la seguridad alimentaria en comunidades andinas (Dilas y Ascurra, 2020).

### **b. Variedades Cultivadas en Cajamarca.**

Según Paredez (2023) en la región Cajamarca se cultivan diversas variedades de oca, que se diferencian principalmente por el color de la piel y la pulpa, así como por sus características agronómicas. Algunas de las variedades más comunes en la zona son:

- ***Oca amarilla:*** De sabor más dulce, especialmente después de la exposición solar poscosecha.
- ***Oca morada:*** De textura más firme y pigmentación intensa, rica en antocianinas.
- ***Oca blanca:*** De sabor suave, común en zonas altas de Cajamarca.
- ***Oca rosada o anaranjada:*** Presenta mayor contenido de azúcares simples, ideal para consumo directo.

Estas variedades son cultivadas principalmente en las provincias de Cutervo, Chota, Celendín y San Miguel, donde forman parte del sistema agrícola tradicional de cultivo en parcelas diversificadas.

### **c. Propiedades Fisicoquímicas y Nutritivas.**

La oca (*Oxalis tuberosa*) presenta una serie de propiedades fisicoquímicas y nutricionales que la convierten en un alimento de gran valor para las poblaciones altoandinas, así como en un producto con potencial agroindustrial, ya que desde el punto de vista fisicoquímico muestra un alto contenido de humedad, que oscila entre el 70% y el 80%, influyendo directamente en su

textura y conservación, con un pH comprendido entre 5.2 y 6.0, que le otorga un perfil ligeramente ácido responsable de su sabor característico y de su estabilidad microbiológica; una de sus características más destacadas es la presencia de almidón en proporciones que varían entre el 11% y el 17%, aunque este valor puede reducirse tras el proceso tradicional de curado, que consiste en exponer el tubérculo al sol, durante el cual parte del almidón se convierte en azúcares simples como la glucosa y la fructosa, intensificando así el dulzor natural de la oca y mejorando su aceptación al consumo (Chávez, 2024).

En cuanto a su composición nutricional, la oca se distingue por ser una fuente energética importante gracias a su contenido de carbohidratos totales, los cuales representan entre el 20% y el 25% de su peso, aportando además una cantidad moderada de proteínas vegetales, aproximadamente entre 1.2% y 2.3%, junto con fibra dietética, mayormente de tipo insoluble, que contribuye al adecuado funcionamiento del sistema digestivo. La oca presenta la sacarosa con un 20.92% y glucosa de 3.63% (Chuquilín Goicochea et al., 2020).

Según Chirinos et al. (2009), el contenido de carbohidratos totales varía entre 13.8-85.2 g/100g de materia seca, con un contenido de almidón de 56.8 g/100g de materia seca. En cuanto a micronutrientes, contiene minerales esenciales como el calcio, fósforo e hierro, así como vitamina C, destacada por su función antioxidante, y vitaminas del complejo B, como la B1 y B2, que favorecen el metabolismo energético, convirtiéndose así en un alimento completo y saludable para la dieta humana, especialmente en regiones altoandinas donde el acceso a alimentos industrializados puede ser limitado (Gualoto, 2021).

Además de sus beneficios nutricionales, la oca presenta propiedades funcionales gracias a la presencia de compuestos bioactivos, entre los cuales destacan las antocianinas, pigmentos naturales presentes principalmente en las variedades moradas y rosadas, que poseen propiedades

antioxidantes capaces de combatir el estrés oxidativo celular y contribuir a la prevención de enfermedades degenerativas; asimismo, contiene flavonoides y polifenoles con efectos antiinflamatorios y protectores del sistema cardiovascular, y si bien la oca también posee ácido oxálico en pequeñas cantidades, compuesto que puede interferir con la absorción de minerales, su presencia no representa un riesgo significativo dentro de una dieta balanceada, lo que refuerza su valor como alimento saludable y funcional (Arteaga et al., 2022).

#### **d. Efectos del Soleado y Cocido en la Oca.**

El proceso tradicional de soleado, también conocido como curado, produce cambios importantes en las propiedades fisicoquímicas de la oca, al ser expuesta al sol durante varios días. Durante este tiempo, parte del almidón se hidroliza y se convierte en azúcares simples como la glucosa y la fructosa, lo que incrementa notablemente su sabor dulce y mejora su palatabilidad. Además, este proceso reduce el contenido de compuestos antinutricionales, como el ácido oxálico, favoreciendo así una mejor absorción de minerales como el calcio y el hierro. El soleado consiste en exponer los tubérculos de oca a la radiación solar directa con el objetivo de incrementar la concentración de azúcares libres y reducir el contenido de ácido oxálico. La radiación solar activa enzimas como la invertasa ácida e invertasa neutra, que estimulan la degradación del almidón e incrementan la concentración de azúcares solubles, incluyendo glucosa, fructosa y sacarosa (Castañeta et al., 2022).

La exposición a la radiación solar constituye un factor determinante en el incremento de azúcares libres, sólidos solubles, capacidad antioxidante y reducción de oxalatos en la oca (Castañeta et al., 2025), siendo el período óptimo de endulzamiento de 5 a 10 días para muestras recién cosechadas y de 3 a 6 días para muestras comerciales, superando los 11 °Brix requeridos para su consumo (Castañeta et al., 2022). En variedades de oca amarilla sometidas a 5 horas

diarias de luz solar, los valores iniciales oscilaron entre 5.4 y 9.0 °Brix, con incrementos progresivos registrados a los 3, 6, 9 y 12 días de exposición solar (Castañeta et al., 2022), donde este enriquecimiento gradual en azúcares fermentables favorece el desarrollo de los microorganismos del kéfir de agua, explicando el mayor crecimiento microbiano observado cuando se emplea oca amarilla como sustrato.

Por otro lado, la cocción de la oca, ya sea mediante hervido o al vapor, también genera modificaciones relevantes en su estructura química, observándose una gelatinización del almidón que mejora su digestibilidad, además de una disminución parcial de algunos compuestos fenólicos, aunque sin eliminar por completo su capacidad antioxidante, asimismo, la cocción ablanda las fibras insolubles, facilitando la masticación y digestión, sin afectar significativamente su valor nutricional general, tanto el soleado como el cocido son técnicas que no solo aumentan la aceptabilidad del producto, sino que optimizan sus beneficios funcionales y nutricionales para el consumo humano (Gamarra Mendoza et al., 2022).

### ***2.2.7. Importancia de la Caracterización Microbiológica***

El análisis microbiológico del kéfir de agua es esencial para garantizar su calidad, seguridad y funcionalidad probiótica.

#### **a. Métodos de Análisis Microbiológico.**

Se emplean diversas técnicas para evaluar la presencia y viabilidad de los microorganismos en el kéfir de agua:

- **Recuento en placa:** Permite cuantificar las poblaciones de bacterias ácido-lácticas (BAL), bacterias ácido-acéticas (BAA) y levaduras presentes en la fermentación.
- **Técnicas moleculares:** Métodos como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) permiten identificar las especies dominantes en el kéfir de agua (Castellanos, 2020).

### **b. Efecto del Recuento Microbiano en la Calidad del Kéfir.**

El recuento microbiano es un indicador clave de la calidad del kéfir, ya que una alta concentración de bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido-acéticas y levaduras favorece sus efectos probióticos y funcionales, y un equilibrio adecuado entre estos microorganismos garantiza una fermentación estable y un producto sensorialmente aceptable (Castillo et al., 2022).

### **c. Relación entre Microbiota y Funcionalidad Probiótica.**

La microbiota del kéfir de agua influye directamente en su potencial probiótico y en sus beneficios para la salud, incluyendo la regulación de la microbiota intestinal y la inhibición de microorganismos patógenos (Ramírez y González, 2024).

## **2.2.8. Aplicaciones del Kéfir de Agua**

El kéfir de agua ha ganado popularidad como bebida probiótica y ha despertado interés en la industria alimentaria por su potencial comercial.

### **a. Consumo Como Bebida Probiótica.**

Debido a su contenido de microorganismos benéficos, el kéfir de agua es una alternativa natural para mejorar la salud intestinal, modular el sistema inmune y mejorar la digestión (Ciappini et al., 2013).

### **b. Posibilidades de Producción Artesanal e Industrial.**

- **Producción artesanal:** Se puede elaborar en el hogar con ingredientes accesibles, permitiendo ajustes en el proceso para modificar su sabor y propiedades funcionales.
- **Producción industrial:** Se están desarrollando procesos de estandarización para garantizar un kéfir de agua con características constantes y mayor estabilidad en el mercado (Heredia et al., 2017).

### **c. Estabilidad en el Mercado.**

El mercado de bebidas fermentadas ha crecido exponencialmente, y el kéfir de agua se presenta como una opción con alto potencial de expansión debido a su versatilidad y beneficios para la salud (Pizard, 2022).

## **2.3. Definición de términos**

### **2.3.1. Kéfir de Agua**

El kéfir de agua es una bebida fermentada obtenida a partir de la fermentación de una solución de agua con azúcar en presencia de gránulos de kéfir, los cuales están compuestos por una matriz de polisacáridos donde coexisten bacterias ácido-lácticas, levaduras y, en menor medida, bacterias ácido-acéticas, cuyo consumo se ha popularizado debido a sus propiedades probióticas y su bajo contenido calórico (Taype, 2023).

### **2.3.2. Fermentación**

La fermentación es un proceso metabólico anaeróbico en el que los microorganismos, como bacterias y levaduras, convierten los azúcares en compuestos como ácido-láctico, etanol y dióxido de carbono, y en el caso del kéfir de agua transforma los azúcares del sustrato en metabolitos beneficiosos para la salud (Chimba y Muso, 2020).

### **2.3.3. Microorganismos**

Los microorganismos son organismos microscópicos que incluyen bacterias, levaduras y hongos, y en el kéfir de agua desempeñan un papel fundamental en el proceso de fermentación, contribuyendo a la formación de compuestos bioactivos y al desarrollo de su perfil sensorial (Astudillo, 2024).

#### **2.3.4. Bacterias Ácido-Lácticas**

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos capaces de fermentar carbohidratos y producir ácido láctico como principal metabolito, entre ellas *Lactobacillus kefiranofaciens* y *Leuconostoc mesenteroides*, que desempeñan un papel fundamental en el kéfir de agua al regular el pH, favorecer la estabilidad microbiana y aportar beneficios probióticos (Londero, 2012).

#### **2.3.5. Bacterias Acido-Acéticas**

Las bacterias ácido-acéticas (BAA) son un grupo de microorganismos caracterizados por su capacidad de producir ácido acético a través de la oxidación de etanol, como la familia Acetobacteraceae. Estas bacterias, son las principales responsables de la producción de diversos ácidos orgánicos a partir de azúcares y alcoholes, influyendo significativamente en la acidez, el potencial antimicrobiano y las características sensoriales de bebidas. ( Ferreira da Silva Rocha, 2024).

#### **2.3.6. Levaduras**

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares que intervienen en la fermentación del kéfir de agua, entre ellas *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida kefir*, que desempeñan un papel clave en la producción de etanol, dióxido de carbono y compuestos aromáticos, lo que influye en la textura, sabor y calidad sensorial del kéfir (Rodas, 2019).

#### **2.3.7. Tiempo de Fermentación**

El tiempo de fermentación es el periodo durante el cual los microorganismos metabolizan los azúcares del sustrato para producir ácidos, etanol y otros compuestos, clasificándose en fermentación corta de 12 a 24 horas, intermedia de 24 a 48 horas y prolongada de más de 48

horas, lo que afecta la acidez, el contenido microbiano y las propiedades organolépticas del kéfir de agua (García, 2024).

### **2.3.8. *Sustratos***

Los sustratos son los componentes utilizados como fuente de energía para los microorganismos durante la fermentación, y en el kéfir de agua los más comunes incluyen azúcar morena, chancaca, miel, jarabes de frutas y extractos vegetales, los cuales influyen en la composición microbiana y en las propiedades funcionales del producto (Ledesma, 2022).

### **2.3.9. *Chancaca***

La chancaca es un tipo de azúcar no refinada obtenida del jugo de caña de azúcar que se solidifica tras un proceso de evaporación sin centrifugado, conteniendo minerales, vitaminas y compuestos bioactivos que pueden mejorar la calidad nutricional del kéfir de agua, además de influir en la actividad microbiana durante la fermentación (Berzero, 2015).

### **2.3.10. *Probióticos***

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped, y en el kéfir de agua las bacterias ácido-lácticas y algunas levaduras actúan como probióticos mejorando la microbiota intestinal, favoreciendo la digestión y fortaleciendo el sistema inmunológico (Castro & De Rovetto, 2006).

### **2.3.11. *Oca.***

La oca (*Oxalis tuberosa*) es un tubérculo andino comestible, cultivado en zonas altas, conocido por su sabor dulce tras la exposición al sol y por su alto valor nutritivo (Dilas y Ascurra, 2020).

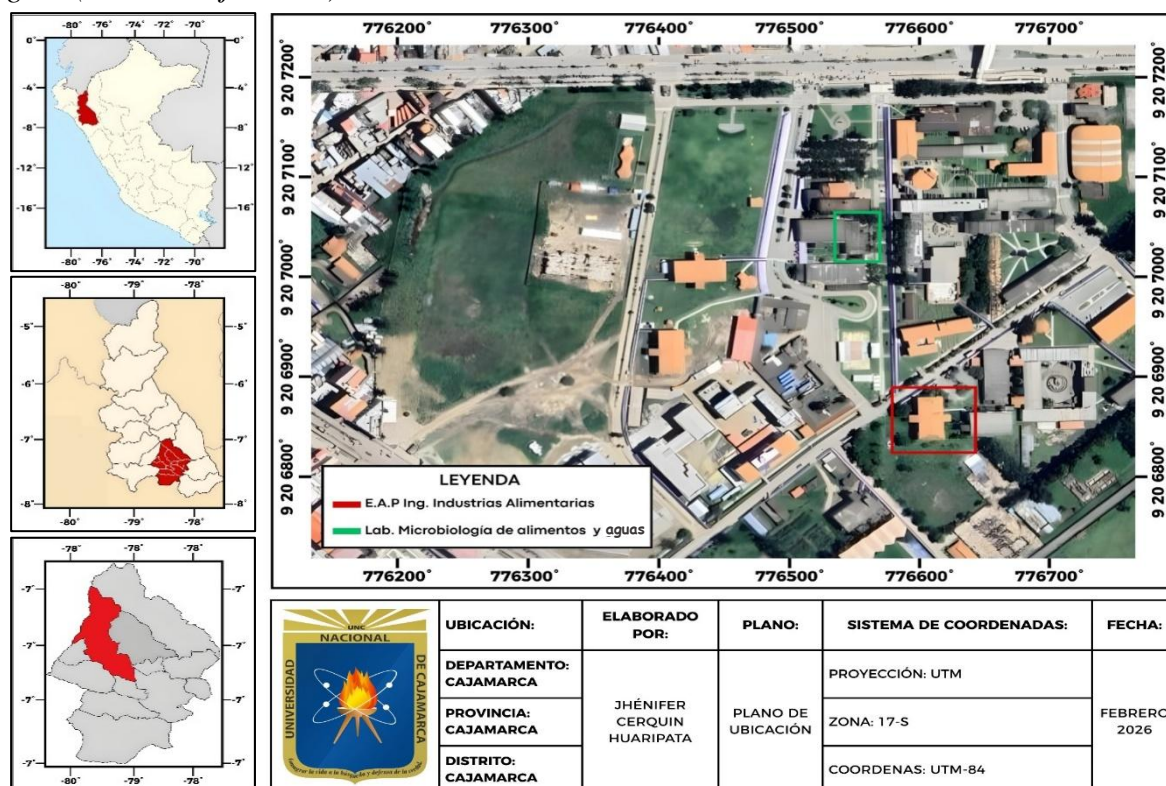
### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación Geográfica

Esta investigación se llevó a cabo específicamente en el Laboratorio de Bioingeniería y Fermentaciones Industriales para el procesamiento del kéfir de agua de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias (edificio 2H - 304) y el análisis microbiológico se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas (edificio 1D - 106) de la Universidad Nacional de Cajamarca (distrito, provincia y departamento de Cajamarca). Ubicada en Av. Atahualpa Km. 03, cuya altitud es de 2750 msnm, 78° 29' 44'' de longitud oeste y 7°10' 01'' latitud sur, con clima templado, seco y soleado durante el día y la noche. Su temperatura media anual es de máximo 21°C y mínimo 6°C.

#### Figura 1

*Mapa de ubicación – E.A.P. Ing. Industrias Alimentarias y laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas (UNC – Cajamarca)*



La fase de proceso del Kéfir de agua se efectuó en el Laboratorio de Bioingeniería y Fermentaciones Industriales de la E. A. P. Ing. en Industrias Alimentarias, edificio 2H - 304. La fase del análisis microbiológico se ejecutó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas, edificio 1D - 106. Universidad Nacional de Cajamarca (Elaboración propia).

### **3.2. Materiales y equipos**

#### **3.2.1. Materias Primas e Insumos**

- Gránulos de Kéfir de agua (tibicos) 100 g, obtenidos de un productor artesanal doméstico de la ciudad de Cajamarca.
- Oca amarilla (*Oxalis tuberosa*) 3 kg, proveniente del centro poblado San José - La Encañada.
- Chancaca, proveniente de la provincia de Cajabamba, específicamente, del Valle de Condebamba.
- Agua potable hervida y fría
- Agua embotellada para consumo humano, libre de gas y apta para su uso alimentario.

#### **3.2.2. Solución y Agares**

- Agar infusión cerebro-corazón (BHI, Brain Heart Infusion) MERCK
- Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) MERCK
- Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGCE, Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) MERCK
- Agar Saboraud MERCK
- Solución salina fisiológica de pH 7.2
- Agua peptonada

### 3.2.3. *Materiales y Equipos de Laboratorio*

- Balanza SARTORIUS; 12 000 g de capacidad, sensibilidad de 0.1 g
- Refractómetro ATC (0-32 ° Brix)
- Ph metro ATC (0.00 – 14.00 pH)
- Termómetro WENMEICE LDT-1819-L
- Incubadora con termostato que pueda ser mantenido a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Contador de colonias
- Microscopio óptico OLYMPUS CX31.
- Matraces o frascos estériles de 250mL, cubiertos con papel aluminio.
- Pipetas graduadas estériles de 1.0 y 10.0 mL.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Pipetas bacteriológicas de 10mL estériles.
- Baño de agua con termómetro, que mantenga la temperatura a  $45 \pm 1.0^\circ\text{C}$ .
- Tubos de ensayo.
- Cajas Petri estériles.
- Portaobjetos, cubreobjetos.
- Asa bacteriológica y asa micológica.
- Cinta testigo.
- Hisopos esterilizados
- Hielo o bolsas refrigerantes.
- Mecheros de Bunsen.
- Cocina de laboratorio
- Cocina industrial

- Licuadora HOLSTEIN

#### **3.2.4. *Otros Materiales***

- Papel toalla
- Alcohol 70%
- Hipoclorito de sodio al 5 % CLOROX
- Cucharas de palo
- Colador de plástico de doble malla
- Gasas de 10 x 10 cm
- Manteles finos de 15x15 cm
- Ligas estándar N° 18
- Frascos de boca ancha con tapa de rosca o tapón esmerilado de material esterilizable.
- Etiquetas autoadheribles.
- Pinzas, tijeras, cucharas de mesa, abatelenguas (para el manejo de muestras).
- Mandil de laboratorio
- Cofia, cubre boca y guantes estériles.
- Laptop ASUS
- Memoria USB de 8 GB
- Cámara fotográfica
- Marcadores indelebles.
- Cinta adhesiva transparente.
- Fósforo

### 3.3. Metodología

#### 3.3.1. Variables

##### a. Variables independientes

- Tipos de Sustratos: Oca amarilla (*Oxalis tuberosa*) y chancaca.
- Tiempos de fermentación: 24, 48 y 72 horas.

##### b. Variable dependiente

- Composición microbiana: bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido-acéticas y levaduras.

#### 3.3.2. Niveles y tratamientos de estudio

**Tabla 1**

*Factores, variables (independientes), niveles y tratamientos en estudio*

|          | <b>Variables Independientes</b> | <b>Niveles</b>                                 | <b>Combinaciones</b> | <b>Tratamientos</b> |
|----------|---------------------------------|--|----------------------|---------------------|
| <b>S</b> | Tipos de sustratos              | S1: Chancaca                                   | S1*T1                | t1                  |
|          |                                 | S2: Oca amarilla<br>( <i>Oxalis tuberosa</i> ) | S1*T2                | t2                  |
|          |                                 |  | S1*T3                | t3                  |
| <b>T</b> | Tiempos de fermentación         | T1: 24 horas                                   | S2*T1                | t4                  |
|          |                                 | T2: 48 horas                                   | S2*T2                | t5                  |
|          |                                 | T3: 72 horas                                   | S3*T3                | t6                  |

*Nota.* En la tabla 1 se describen los factores, variables (independientes), niveles y tratamiento de estudio.

#### 3.3.3. Diseño Experimental, Arreglos de los Tratamientos

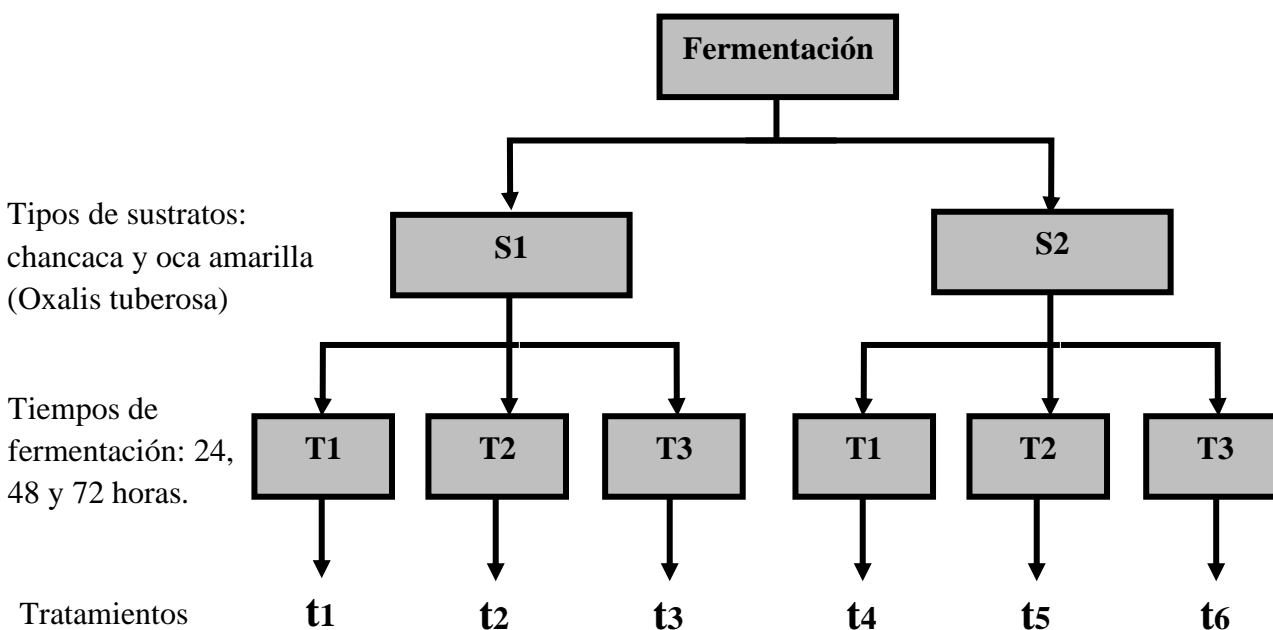
El diseño experimental que se empleó es un diseño DCA (diseño completamente al azar) con 3 repeticiones y estructuras factoriales 2S x 3T. En el factor S tenemos a los sustratos (S1 = Chancaca y S2 = Oca amarilla (*Oxalis tuberosa*)). El factor T corresponde al tiempo de fermentación (T1 = 24 h, T2 = 48 h, T3 = 72 h), de las cuales se realizaron 3 combinaciones de cada una obteniendo un total de 6 tratamientos. Estos tratamientos fueron replicados 3 veces

haciendo un total de 18 muestras. Se realizó el análisis microbiológico de bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras, con el objetivo de establecer que formulación posee la mejor concentración de microbiota en el kéfir de agua artesanal en función al tipo de sustrato y tiempo de fermentación. Se llevo a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para los resultados. Detectándose variaciones, por tal motivo se aplicó el test de rango múltiple de Tukey al 0.05.

A continuación, se muestra el esquema del diseño experimental en la figura 2.

**Figura 2**

*Diseño experimental*



*Nota.* En esta figura se describe el diagrama del diseño experimental para la evaluación de análisis microbiológico de la elaboración del kéfir de agua artesanal con diferentes tipos de sustratos y tiempos de fermentación.

Donde:

S1: Chancaca

S2: Oca amarilla

T1: tiempo de fermentación de 24 horas

T2: tiempo de fermentación de 48 horas

T3: tiempo de fermentación de 72 horas

Total, de 6 tratamientos.

**Tratamiento 1:** Chancaca (S1) + 24 horas de fermentación (T1)

**Tratamiento 2:** Chancaca (S1) + 48 horas de fermentación (T2)

**Tratamiento 3:** Chancaca (S1) + 72 horas de fermentación (T3)

**Tratamiento 4:** Oca amarilla (S2) + 24 horas de fermentación (T1)

**Tratamiento 5:** Oca amarilla (S2) + 48 horas de fermentación (T2)

**Tratamiento 6:** Oca amarilla (S2) + 72 horas de fermentación (T3)

Se tomaron dichos tratamientos para la evaluación microbiológica del kéfir de agua artesanal.

#### **3.3.4. Procedimiento**

La materia prima que se utilizó en esta investigación son los gránulos de kéfir de agua o también conocidos como tibicos. El proceso del Kéfir de agua artesanal se realizó en el laboratorio de Bioingeniería y Fermentaciones Industriales de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias, edificio 2H - 304. El análisis microbiológico se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas, edificio 1D - 106. Cada etapa de los procesos descrito a continuación fue documentada fotográficamente y se puede consultar en el Anexo B.

##### **a. Preparación de la Disolución del Sustrato Chancaca.**

- **Recepción de la chancaca:** la chancaca fue adquirida del valle de Condebamba, provincia de Cajabamba. Se utilizó chancaca de alta calidad, firme, de color marrón

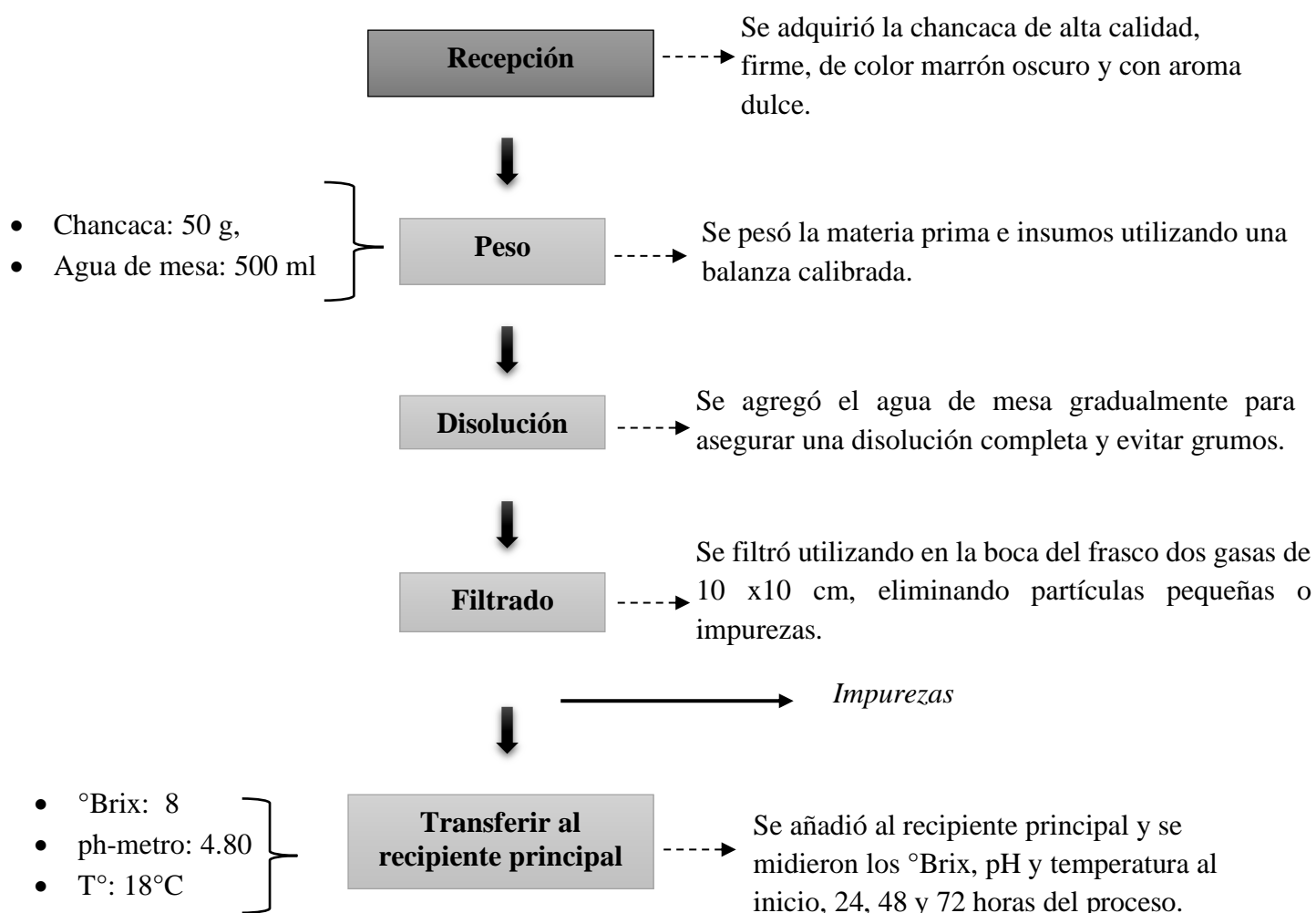
oscuro y con aroma dulce; puesto que, la calidad de la chancaca influyó directamente en el sabor y la concentración de azúcar de la solución; además se evitó la chancaca seca, así como aquella con olor a moho (ver Figura B1.1).

- **Pesado:** el pesado de la materia prima e insumos se realizó utilizando una balanza digital calibrada, con el propósito de asegurar la precisión en la cantidad de ingredientes empleados en el proceso de elaboración; por lo tanto, se pesaron exactamente 50 g de chancaca y se midieron 500 ml de agua embotellada para consumo humano, libre de gas y apta para su uso alimentario (ver Figura B1.2 y B1.3).
- **Disolución:** se agregó pequeñas cantidades de agua gradualmente para facilitar la disolución hasta verter los 500 ml, ya que es crucial remover la mezcla constantemente para asegurar una disolución completa y evitar grumos (ver Figura B1.4).
- **Filtración:** la disolución se vertió en otro frasco utilizando en la boca del frasco dos gasas de 10 x10 cm para eliminar cualquier partícula pequeña de chancaca o impureza. Es importante que todos los materiales utilizados estén limpios y libres de contaminantes para garantizar la calidad y seguridad del producto final (ver Figura B1.5).
- **Transferencia al recipiente:** se transfirió a un recipiente adecuado y limpio para su uso posterior en la elaboración del kéfir artesanal.
- **Medición de °Brix y otros parámetros:** la concentración de azúcar en la solución se evaluó mediante un refractómetro obteniéndose un valor inicial 8° brix. Esta evaluación a resultado fundamental para establecer la cantidad adecuada de azúcar en el proceso de fermentación, ya que un exceso podría obstaculizar el crecimiento de los microorganismos del kéfir de agua, mientras que una concentración baja podría limitar su desarrollo adecuado. Cabe destacar que la concentración de °Brix obtenida en la solución

fue igual a la registrada para la oca; adicionalmente, mediante el uso de un pH-metro y un termómetro, se registraron como parámetros iniciales un valor de pH de 4.80 y una temperatura ambiente de 18 °C respectivamente. Estos datos son esenciales para el control y éxito del proceso fermentativo (ver Figura B1.6 a B1.8). El procedimiento es señalado en la Figura 3.

### Figura 3

*Diagrama de flujo para la disolución de la chancaca*



*Nota.* Diagrama de flujo para la disolución de la chancaca en la producción artesanal del Kéfir de agua. Fuente: Adaptado de Gutiérrez Mosquera et al. (2018).

## **b. Preparación del Sustrato Oca Amarilla.**

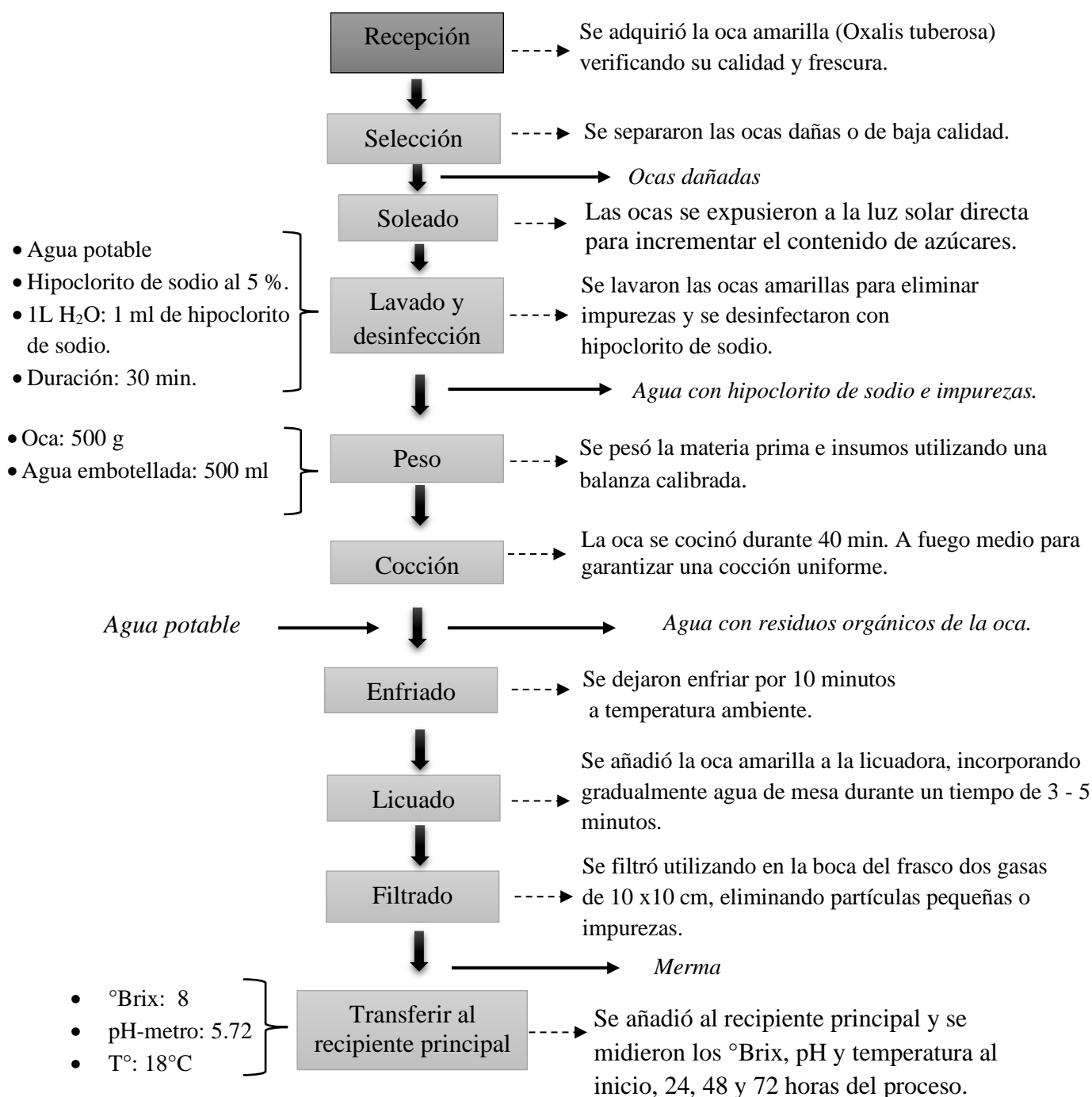
- **Recepción de la oca amarilla (*Oxalis tuberosa*):** la oca amarilla fue adquirida del centro poblado San José, ubicada en el distrito de la Encañada ubicado en las coordenadas geográficas 7°04'48.46"S, 78°14'50.95"W. Al obtenerla, se verificó su calidad y frescura, lo que es fundamental para garantizar la calidad en la preparación de la solución (ver Figura B2.1).
- **Selección:** se seleccionaron las ocas dañadas o de baja calidad para su separación, ya que era fundamental eliminar cualquier riesgo de contaminación o deterioro del producto final.
- **Soleado:** las ocas seleccionadas se expusieron a la luz solar directa durante un período determinado (aprox. 14 días). Este proceso tradicional permitió incrementar el contenido de azúcares mediante la conversión de almidones y reducir la acidez característica del tubérculo, se colocaron en una superficie limpia y se voltearon periódicamente para garantizar una exposición uniforme (ver Figura B2.2).
- **Lavado y desinfección:** las ocas seleccionadas se lavaron con agua potable para eliminar cualquier suciedad o impureza que puedan estar presentes en su superficie. Después del lavado, es importante desinfectar para eliminar cualquier microorganismo patógeno, para ello, se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 5 % (1 ml de hipoclorito de sodio por 1L de agua), según las recomendaciones de Instituto Nacional de Calidad (INACAL, 2020) durante 30 minutos (DIGESA, 2010).
- **Cocción:** la oca se cocinó durante 40 min utilizando fuego medio, es decir, una llama moderada, ni muy baja ni muy alta, para garantizar una cocción uniforme. Este proceso se realizó en una cocina industrial, lo que permitió mantener un control constante y

preciso de la temperatura. Puesto que, mantener una llama moderada proporciona un equilibrio adecuado para que las ocas se cocinen correctamente y conserven sus propiedades organolépticas y nutricionales (ver Figura B2.3).

- **Peso:** Se pesaron exactamente 500 g de oca amarilla (*Oxalis tuberosa*) y se midieron 500 ml de agua embotellada para consumo humano, libre de gas y apta para su uso alimentario, utilizando una balanza digital calibrada; esto permitió obtener cantidades precisas, lo cual fue fundamental para la correcta elaboración del producto (ver Figura B2.3 y B2.4).
- **Enfriamiento:** las ocas se dejaron enfriar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- **Licuada:** se mezcló con el agua embotellada la cual se añadió lentamente en pequeñas cantidades hasta completar los 500 ml para facilitar una integración uniforme, esta mezcla se procesó utilizando una licuadora durante un tiempo de 3 - 5 minutos, lo que permitió obtener una mezcla homogénea (ver Figura B2.5).
- **Filtrado:** la mezcla se transfirió a otro frasco usando gasas de 10 x 10 cm en la boca del frasco para filtrar pequeñas partículas de la oca (ver Figura B2.6).
- **Transferencia al recipiente principal:** finalmente, la mezcla se transfirió al recipiente principal para el uso posterior en la preparación del kéfir de agua artesanal.
- **Medición de °Brix y otros parámetros:** se midió los niveles de azúcar (°Brix) en la mezcla para determinar su concentración mediante un refractómetro, dando un valor inicial de 8 °Brix. Esta evaluación será fundamental para establecer la cantidad idónea de azúcar necesaria en el proceso de fermentación. Además, esta preparación debe tener la misma concentración de azúcar que la preparación de la solución de chancaca. Adicionalmente, mediante un pH-metro y termómetro, se registraron un pH de 5.72 y una temperatura ambiente de 18 °C (ver Figura B2.7 a B2.9). El procedimiento es señalado en la Figura 4.

**Figura 4**

Diagrama de flujo del sustrato oca amarilla (*Oxalis tuberosa*)



*Nota.* Diagrama de flujo para la preparación del sustrato de oca amarilla en la producción artesanal del Kéfir de agua. Fuente: Adaptado de Dorantes Fuertes et al. (2024) y Meyhuay (2001).

### c. Proceso para la Elaboración del Kéfir de Agua Artesanal.

- **Recepción:** los granos de Kéfir de agua, fueron obtenidos de un productor artesanal que cultivaba Kéfir de agua en su domicilio, en la ciudad de Cajamarca. Estos granos pasaron por varias fermentaciones consecutivas en un medio casero común, con el fin de conseguir la cantidad necesaria (100 g) para empezar con el proceso de fermentación (ver Figura B3.1).
- **Peso:** Se pesaron los gránulos de kéfir de agua utilizando una balanza digital calibrada para obtener una medición precisa. Primero, se colocó un recipiente limpio y seco sobre la balanza y se taró para que la lectura fuera cero. Luego, se añadieron cuidadosamente los gránulos al recipiente hasta alcanzar un peso de 40 g de kéfir de agua (Kombucha Perú, 2023). Este procedimiento se hizo para los dos frascos (ver Figura B3.2).
- **Lavado:** el kéfir de agua fue lavado con agua fría previamente hervida, utilizando un colador de plástico doble malla para evitar daños en los gránulos. Es fundamental realizar el lavado con delicadeza, para mantener la vitalidad de los nódulos. Además, se recomienda evitar el contacto con utensilios metálicos que pueden alterar el proceso de fermentación y afectar la calidad del kéfir de agua. Este cuidadoso proceso garantiza un kéfir limpio y libre de contaminantes, preservando sus propiedades beneficiosas (ver Figura B3.3).
- **Ecurrido:** se colocaron los granos en un colador limpio para permitir que el agua residual se escurriera de forma natural, sin aplicar presión, evitando así dañar los nódulos. Este proceso permitió eliminar el exceso de humedad, facilitando la manipulación y asegurando la calidad del kéfir de agua en las fermentaciones posteriores (ver Figura B3.3).

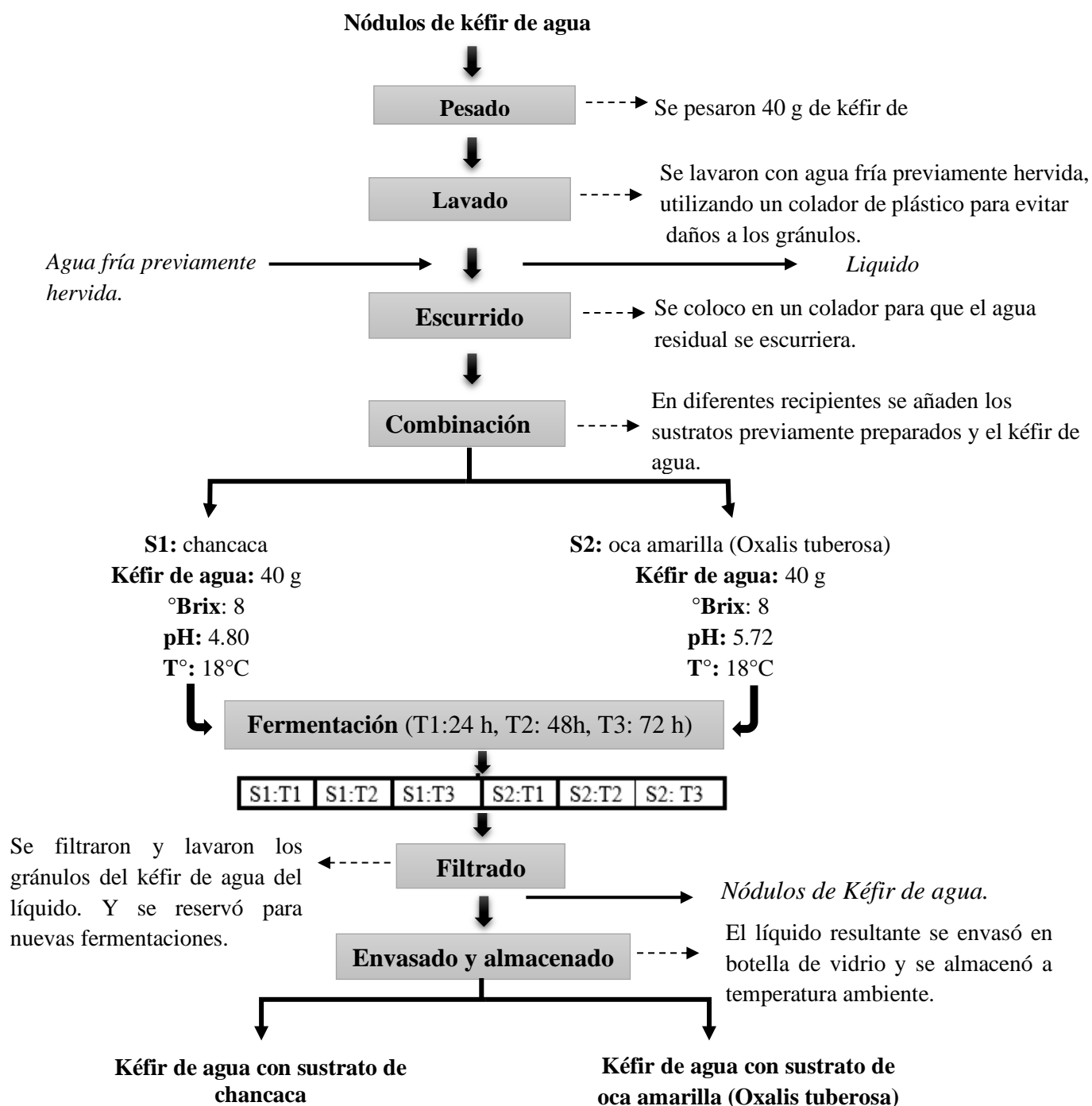
- Se asignaron recipientes de vidrio limpio de boca ancha, separados para cada sustrato, capacidad de dos litros. Es importante elegir un recipiente o fermentador que sea lo suficientemente grande para acomodar los granos de kéfir o tibicos.
- **Combinación:** en esta etapa se colocaron los granos de kéfir de agua y se añadieron los sustratos: la chancaca y la oca amarilla, anteriormente preparados, dejando espacio libre en la parte superior del frasco para la fermentación. Se utilizó un refractómetro para medir la concentración de azúcar, obteniendo un valor de 8 °brix, con el fin de garantizar que ambos sustratos tuvieran un equilibrio perfecto en su combinación y así obtener resultados más consistentes y reproducibles en el análisis microbiológico. Esto contribuyó a la calidad y consistencia óptima de la bebida final del kéfir de agua. Adicionalmente se midió el pH inicial obteniendo un valor de 5.72 en la oca y un pH de 4.80 en la chancaca, además se registró una temperatura ambiente de 18°C en ambos sustratos (ver Figura B3.4).
- **Fermentación:** se procedió a una fermentación aerobia (con oxígeno). Para cubrir el frasco se tapó con un paño o una tela fina y una liga para ajustar, permitiendo la entrada de oxígeno y la salida de CO<sub>2</sub>, pero evitando el ingreso de polvo o insectos pequeños, como la mosca de la fruta; posteriormente, se ubicó el frasco en un área con poca iluminación a temperatura ambiente. El seguimiento y análisis microbiológico de la fermentación se realizó durante las 24, 48 y 72 horas, después de haber añadido los cultivos e ingredientes; evaluando la concentración de microorganismos como bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras, en función del tipo de sustrato y tiempo de fermentación (ver Figura B3.5).

- **Filtrado y separación de los granos del kéfir de agua:** después de completar el proceso de fermentación, se filtró y se separó los gránulos del kéfir de agua del líquido, mediante un colador de plástico, además, los gránulos se lavaron ligeramente y se reservaron para nuevas fermentaciones.
- **Envasado y almacenado:** una vez transcurrido el tiempo de fermentación del kéfir de agua y filtrado, el líquido resultante se envasará en botellas de vidrio para su consumo inmediato. El almacenamiento se realizará a temperatura ambiente.

El procedimiento es señalado en la Figura 05.

Figura 5

Diagrama de bloques de la elaboración del Kéfir de agua artesanal



Nota. Diagrama de bloques de la elaboración del Kéfir de agua artesanal con diferentes sustratos y tiempos de fermentación. Fuente: Adaptación de Cia (2024).

#### **d. Análisis Microbiológico.**

##### ***i. Preparación y Dilución de Muestras del Kéfir de Agua para su Análisis***

**Microbiológico.** Este método se basó en el uso de un diluyente que optimice la recuperación de microorganismos viables, facilitando su crecimiento en cultivo. El diluyente tiene la osmolaridad y el pH adecuado para reactivar las células microbianas, especialmente las de interés en una población mixta. Se determinó el número de microorganismos por unidad de volumen mediante diluciones decimales seriadas en el mismo diluyente, hasta obtener un resultado cuantificable tras la incubación. Este resultado se expresó como unidades formadoras de colonias (UFC/caja) en placas o mediante la observación de resultados proporcionales al tamaño de la población en tubos o matraces (APHA, 2015; ICMSF, 1983).

##### **Medios de cultivo y diluyentes**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, con 90.0 ml de agua peptonada al 0.1%, o con solución salina fisiológica (SSF), al 0.5%.
- De 4 a 6 tubos de ensayo conteniendo 9.0 ml de agua peptonada al 0.1% o con solución salina fisiológica (SSF) al 0.5%.

##### **Preparación de la dilución primaria**

- Se pesó 10.0 g de kéfir de agua en una bolsa plástica estéril.
- Se añadió 90.0 ml del diluyente (a temperatura similar a la muestra) contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, obteniendo así una dilución 1:10.
- Se homogenizó durante 1 min, hasta obtener una suspensión completa y homogénea, según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Si el movimiento es lento, el tiempo de homogenización debe ser < 2.5 minutos.

- Se permitió que las partículas grandes se sedimenten y transfieran la suspensión al matraz Erlenmeyer, tomando ésta de las capas superiores de la suspensión. Si la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, se adicionará más diluyente, el cual debe de registrarse y tomarse en cuenta para los cálculos y expresión de resultados.

### **Preparación de las diluciones decimales adicionales**

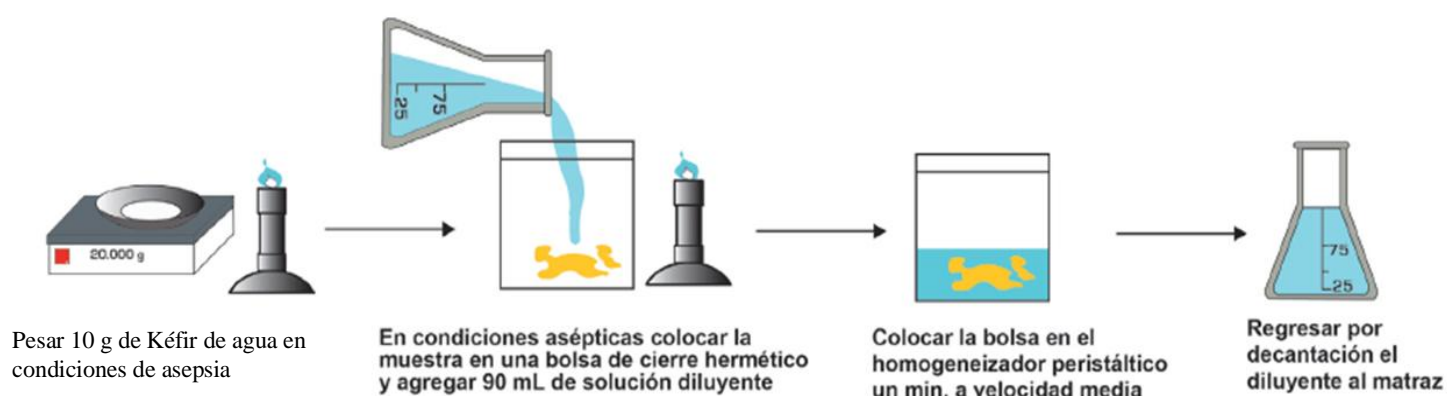
- Tras obtener la suspensión del alimento en el diluyente, se realizó las diluciones decimales adicionales de la siguiente manera:
- Se Transfirió un 1.0 ml o un múltiplo de la dilución primaria, a otro recipiente que contenga nueve volúmenes del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Si se toma 1.0 ml de muestra en 9.0 ml de diluyente, se obtendrá una dilución 1:10; si se utilizan 10.0 ml de muestra se utilizarán 90.0 ml de diluyente y así se tendrá la misma dilución 1:10, pero 1:100, con respecto a la muestra original.
- Se mezcló cuidadosamente cada nueva dilución, siguiendo el mismo procedimiento en cada caso.
- La selección de las diluciones preparadas, así como de aquellas que se van a inocular, depende del número esperado de microorganismos en la muestra, con base en la información que se obtenga. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta (1:1000000 o 10<sup>-6</sup>).
- Se utilizó pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente, ya sea en las cajas de Petri, tubos, matraces, placas Petrifilm, entre otros. El volumen transferido debe ser > 10% de la capacidad total de la pipeta. Si es terminal y se transfiere su capacidad

total, se escurriría aplicando la punta una sola vez en un área del dispositivo a inocular seleccionada.

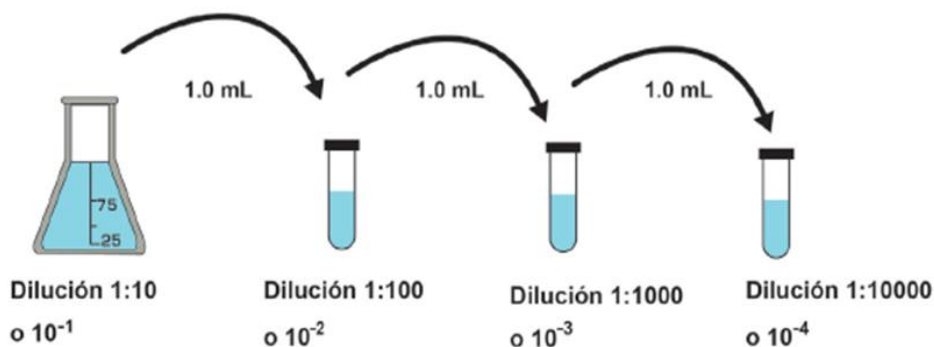
- Mientras se afora el líquido en la pipeta, su punta se apoyó en el interior del cuello del frasco, manteniéndola vertical; para ello, el frasco se inclinó según sea lo necesario. El procedimiento es señalado en la Figura 6.

## Figura 6

### *Preparación y dilución de muestras para sus análisis microbiológicos*



A partir del matraz que contiene la muestra homogeneizada realizar diluciones decimales seriadas, empleando para ello tubos con 9.0 mL de solución diluyente



*Nota:* Esquema de la preparación y dilución de muestras para sus análisis microbiológicos.

Fuente: adaptado de Hernández, H. A., & Giles, M. (2021).

ii. ***Determinación de Bacterias Ácidos Lácticas en el Kéfir de Agua.*** Se empleó un método de recuento en placa basado en la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo o mililitro de muestra. Se asumió que cada colonia desarrollada en el medio de cultivo seleccionado, tras la incubación a la temperatura adecuada, procede de un microorganismo (o agregado de microorganismos) presente en la muestra y fijado en el agar, capaz de formar dicha colonia (UFC). Para asegurar un conteo confiable, se realizó las diluciones decimales necesarias de la muestra antes de la siembra en el medio de cultivo (APHA, 2015; ICMSF, 1983).

#### **Medios de cultivo y diluyentes**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250mL de capacidad, con 90mL de agua peptonada o caldo BHI.  
(a)
- 4 a 6 tubos de ensayo, con 9mL de agua peptonada caldo BHI.
- 6 a 18 cajas de Petri con 20mL c/u, de agar MRS (para técnica de extensión en superficie).

#### **Procedimiento**

- Se distribuyó las cajas estériles en la mesa de trabajo para facilitar la inoculación y la adición del medio de cultivo. Se marcaron las bases de las cajas con la información pertinente antes de la inoculación.
- Se inoculó por duplicado, distribuyendo 1 mL de cada dilución en cada caja con una pipeta automática y punta estéril. Se añadió entre 18 y 20 mL del medio de cultivo fundido mantenido a 45 °C.
- Para homogenizar, se realizó una mezcla mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a

adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; evitando que el medio moje la cubierta de las cajas. Se dejó solidificar. El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

- Se incluyó una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente, preparado como testigo de esterilidad.
- Se incubó las cajas en posición invertida durante el tiempo y a la temperatura que se requiera, como se indica en la Tabla siguiente.

**Tabla 2**

*Condiciones de incubación para cuenta en placa de diferentes grupos*

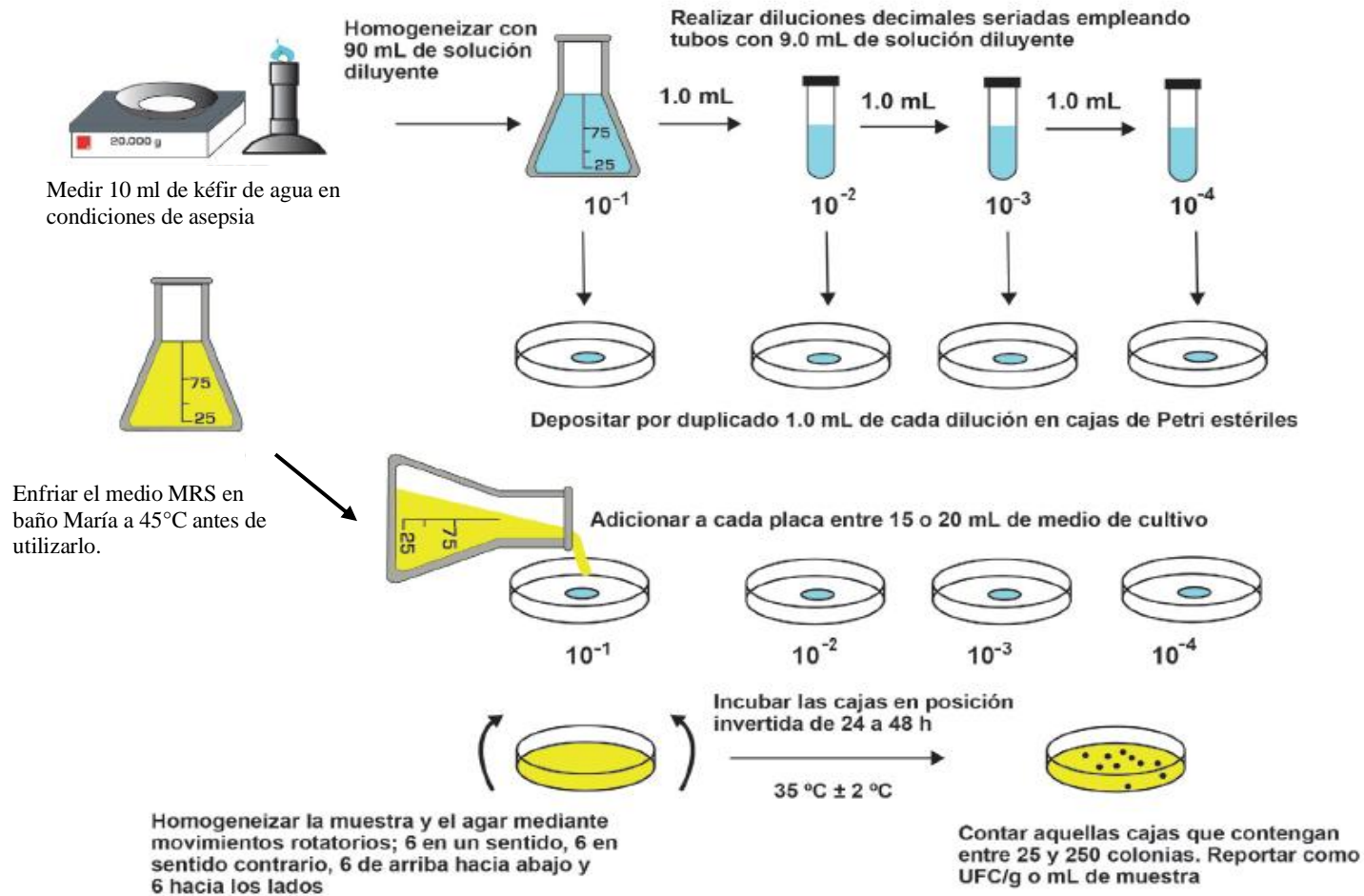
| <b>Grupo bacteriano</b> | <b>Temperatura</b> | <b>Tiempo de incubación</b> |
|-------------------------|--------------------|-----------------------------|
| <b>Termofílicos</b>     | 55 +- 2°C          | 48 +- 2 h                   |
| <b>Mesofílicos</b>      | 35 +- 2°C          | 48 +- 2 h                   |
| <b>Psicrotróficos</b>   | 20 +- 2°C          | De 3 a 5 días               |
| <b>Psicrofílicos</b>    | 5 +- 2°C           | De 7 a 10 días              |

*Nota.* Las bacterias ácido lácticas se incuban durante 48 h (Hernández, H. A., & Giles, M. 2021).

El procedimiento es señalado en la Figura 7.

Figura 7

*Determinación de Bacterias Ácido Lácticas en el Kéfir de Agua*



*Nota:* Esquema para determinar las Bacterias Ácido Lácticas en el Kéfir de Agua. Fuente: adaptado de Hernández, H. A., & Giles, M. (2021)

iii. ***Determinación de Bacterias Ácidos Acéticas en el Kéfir de Agua.*** Este método se basó en la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) en un gramo o mililitro de la muestra. Cada colonia que surja en el medio de cultivo elegido después de un período de incubación a la temperatura adecuada se originará de microorganismos presentes en la muestra y atrapados en el agar; estos microorganismos serán capaces de formar la colonia, es decir, una UFC. Para garantizar un conteo confiable de las colonias, se realizarán las diluciones decimales necesarias antes de sembrar la muestra en el medio de cultivo (APHA, 2015; ICMSF, 1983).

#### **Medios de cultivo y diluyentes**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250mL de capacidad, con 90mL de agua peptonada o caldo BHI.
- 4 a 6 tubos de ensayo, con 9mL de agua peptonada caldo BHI.
- 6 a 12 cajas de Petri con 20mL c/u, de agar MA y/o YGCE (para técnica de extensión en superficie).

#### **Procedimiento**

- Se distribuyó las cajas estériles en la mesa de trabajo de forma que la inoculación y la adición de medio de cultivo puedan ser llevadas a cabo de manera cómoda y sin obstáculos. Antes de la inoculación, se marcaron las bases de las cajas con la información relevante para su identificación.
- Se realizó la inoculación por duplicado de 1 mL de la dilución correspondiente en cada caja, utilizando una pipeta automática con punta estéril. Se agregaron de 18 a 20 mL de medio fundido y mantenido a 45 °C. Para homogeneizar, se mezcló con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio, teniendo cuidado de que el medio no alcance la

tapa de las cajas. Posteriormente, se dejó solidificar el medio. El lapso de tiempo desde la incorporación de la muestra al diluyente hasta la adición del medio de cultivo a las cajas no deberá sobrepasar los 20 minutos.

- Se incluyó una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente, preparado como testigo de esterilidad.
- Se incubó las cajas en posición invertida durante el tiempo y a la temperatura que se requiera, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, como se indica en la tabla siguiente.

**Tabla 3**

*Condiciones de incubación para cuenta en placa de diferentes grupos*

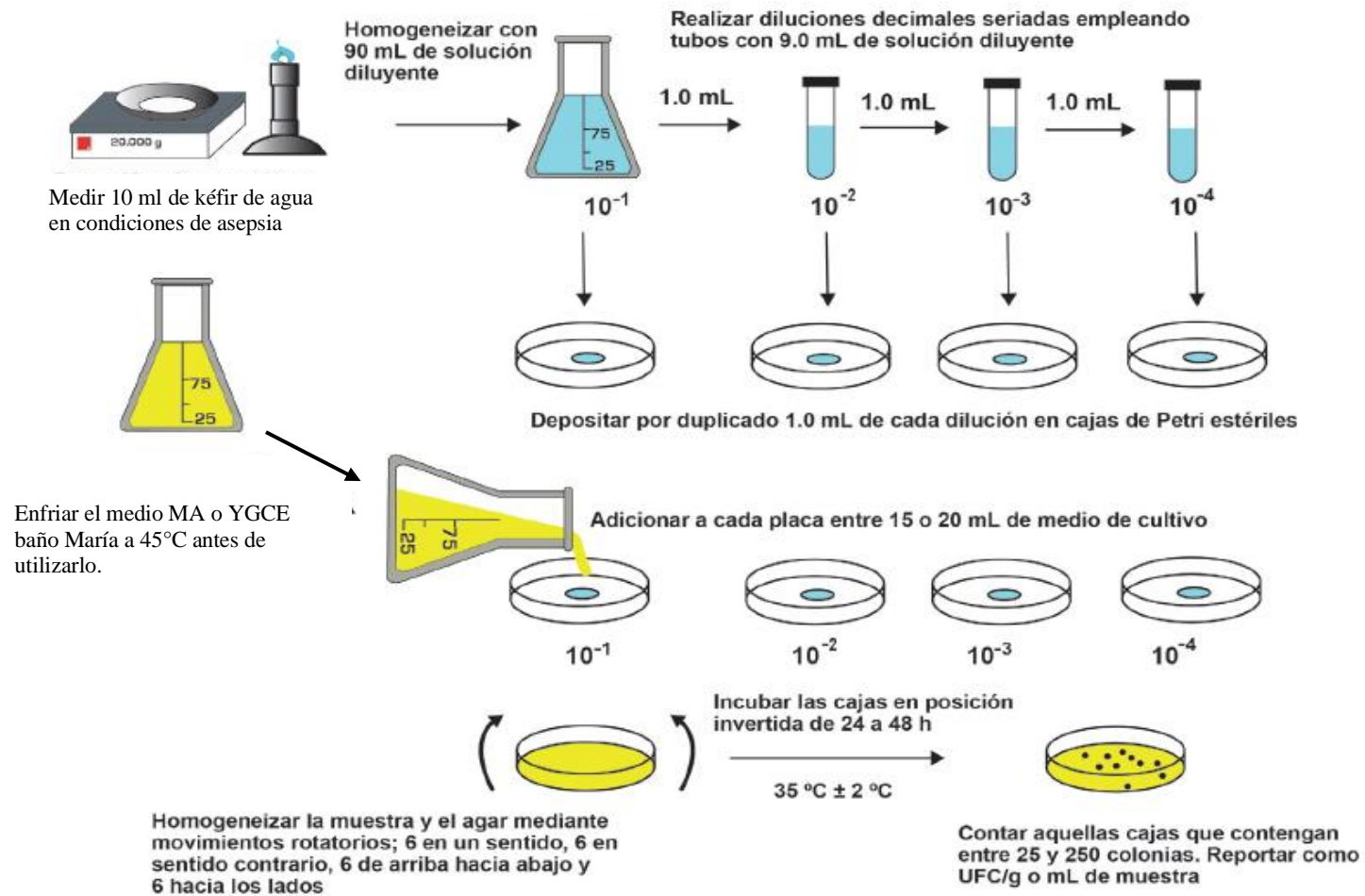
| <b>Grupo bacteriano</b> | <b>Temperatura</b> | <b>Tiempo de incubación</b> |
|-------------------------|--------------------|-----------------------------|
| <b>Termofílicos</b>     | 55 +- 2°C          | 48 +- 2 h                   |
| <b>Mesofílicos</b>      | 35 +- 2°C          | 48 +- 2 h                   |
| <b>Psicrotróficos</b>   | 20 +- 2°C          | De 3 a 5 días               |
| <b>Psicrofílicos</b>    | 5 +- 2°C           | De 7 a 10 días              |

*Nota.* Las bacterias ácido acéticas se incuban durante 48 h (Hernández, H. A., & Giles, M. 2021).

El procedimiento es señalado en la Figura 8.

Figura 8

*Determinación de Bacterias Ácido Acéticas en el Kéfir de Agua*



*Nota:* Esquema para determinar las Bacterias Ácido Acéticas en el Kéfir de Agua. Fuente: adaptado de Hernández, H. A., & Giles, M. (2021).

iv. *Determinación de Levaduras en el Kéfir de Agua*. El método se basó en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3.5 e incubado a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos. Esta prueba se lleva a cabo en condiciones de aerobiosis, que son adecuadas para estos grupos (APHA, 2015; ICMSF, 1983).

#### **Medios de cultivo y diluyentes**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250ml de capacidad, conteniendo 90.0ml de solución salina fisiológica de pH 7.2, estéril.
- 3 tubos, con 9.0mL de solución salina fisiológica de pH 7.2, estériles con tapón de algodón.

#### **Procedimiento**

- Se midió 10 ml de muestra en una caja Petri estéril y pasará a un matraz Erlenmeyer que contenga 90.0 ml de solución salina fisiológica de pH 7.2 o agua peptonada al 0.1%.
- Se homogenizó la muestra con la solución anterior durante 10 segundos. Esta será la dilución primaria.
- De la suspensión o solución anterior, se tomó 1.0 ml y se transfirió a un tubo de ensayo que contenga 9.0ml de solución salina fisiológica de pH 7.2. Se agitó y se repetirá esta operación tantas veces como diluciones sean necesarias. Se debe utilizar una punta estéril en la pipeta, para cada dilución.
- Se colocó por duplicado en cajas de Petri estériles 1.0 ml de cada una de las diluciones de la muestra, utilizando una pipeta estéril.

- En cada caja de Petri con inóculo, se vertió de 15 a 20mL de agar Saboraud, mantenido a 45 °C. El tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y el momento en que es vertido el medio de cultivo no debe de exceder de 20 min.
- Se mezcló cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás hacia adelante, sobre una superficie lisa, teniendo cuidado de no humedecer con el medio la tapa de la caja de Petri. Permitiendo que la mezcla en las cajas de Petri solidifique, dejándolas reposar sobre una superficie horizontal fría.
- Se voltearon las cajas y se colocaron en la incubadora a  $37 \pm 1$  °C.
- Se contaron las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación, seleccionando aquellas con entre 10 y 150 colonias. Si hay crecimiento extendido de levaduras o dificultad para contar colonias aisladas, se consideró la cuantificación a los 4 o 3 días de incubación.
- Los microorganismos levaduriformes formaron las colonias a partir de una espora.
- Se consideraron las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para la investigación. Multiplicando por el inverso de la dilución.
- Se informaron las unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de levaduras, incubadas a  $37 \pm 1$  °C durante 5 días.
- **Para completar el ejercicio:** Se realizó una tinción por impronta húmeda para levaduras con colorante de lactofenol azul de algodón, para un examen microscópico e identificación presuntiva de las levaduras desarrolladas. Se realizó una tinción simple para la observación microscópica de las levaduras obtenidas. Se describieron las

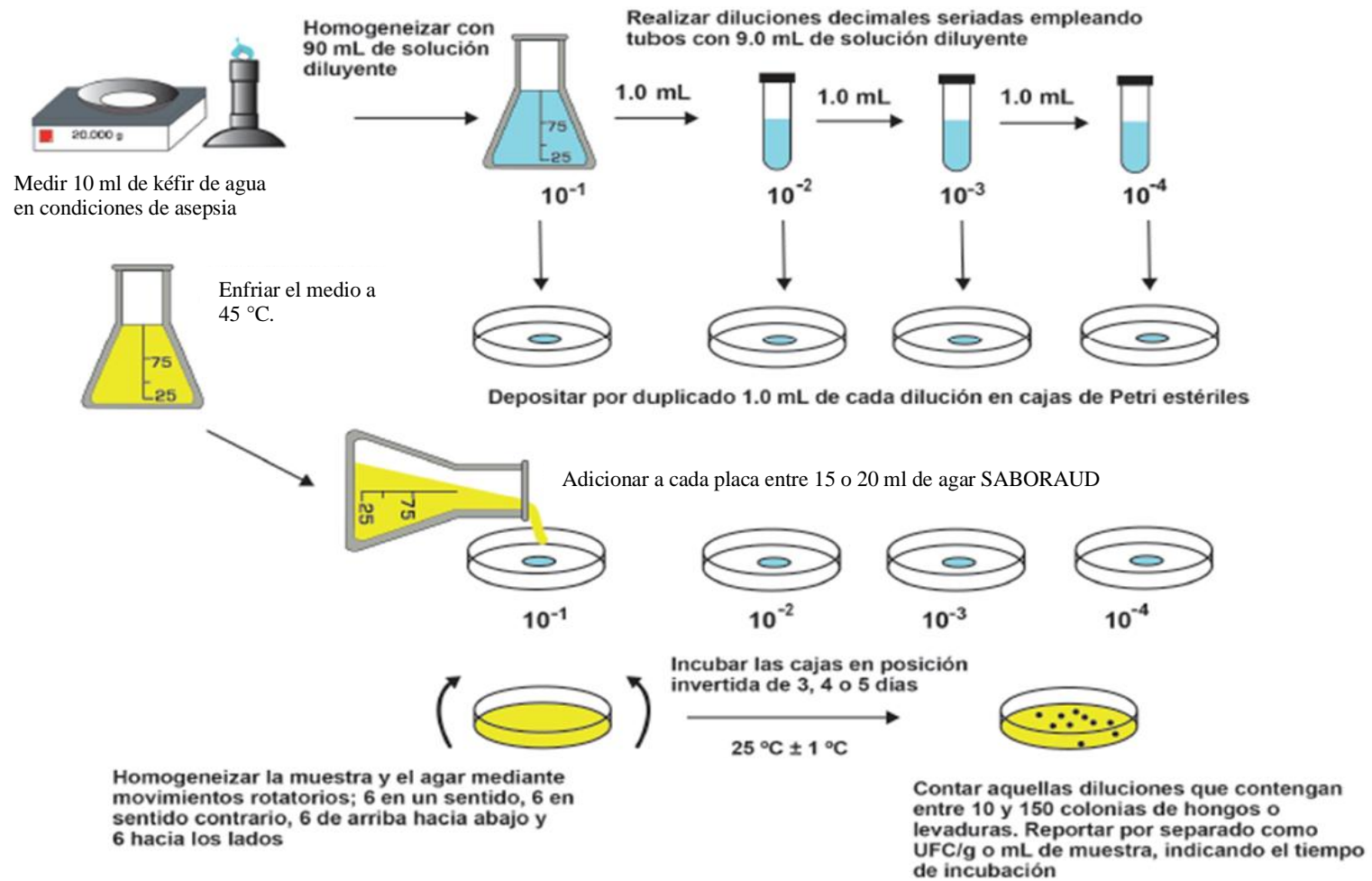
características macroscópicas y microscópicas de las levaduras desarrolladas a partir de la muestra analizada.

v. **Análisis Cualitativo.** Se reportaron las observaciones macroscópicas y microscópicas de las levaduras obtenidas durante el análisis, incluyendo la identificación presuntiva de los géneros.

El procedimiento es señalado en la Figura 9.

Figura 9

## Determinación de Levaduras en el Kéfir de Agua

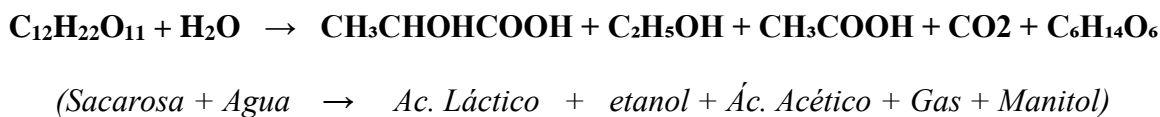


Nota: Esquema para determinar las Levaduras en el Kéfir de Agua. Fuente: adaptado de Hernández, H. A., & Giles, M. (2021).

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el proceso de fermentación del kéfir de agua elaborado con oca y chancaca. En primer lugar, se presenta los análisis de varianza de las poblaciones de bacterias ácido-lácticas (BAL), bacterias ácido-acéticas (BAA) y levaduras, con el fin de determinar el efecto del sustrato y el tiempo de fermentación sobre la composición microbiana del kéfir de agua. Posteriormente, se muestran los valores de °Brix y pH registrados en los tres tiempos de fermentación evaluados, los cuales permiten observar los cambios fisicoquímicos que ocurren en la bebida durante el proceso fermentativo.

La fermentación del kéfir de agua es más compleja de lo que parece, porque la fermentación es un proceso consorcial. Estos microorganismos llevan a cabo la fermentación de la sacarosa, produciendo así exopolisacáridos, necesarios para el crecimiento de los gránulos de kéfir de agua, y ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono (de Almeida et al., 2025; Verce et al., 2019).



Primero se da una fermentación aeróbica, y se vuelve gradualmente anaeróbica a medida que el oxígeno es consumido y/o eliminado por el dióxido de carbono producido por las levaduras. La sacarosa se metaboliza en etanol, dióxido de carbono, ácido láctico, ácido acético, manitol, vitaminas, aminoácidos, glicerol, ésteres y otros ácidos orgánicos. De esta manera, la concentración de sacarosa disminuye hasta en un 98 % en las primeras 24 h de fermentación.

En la dinámica común de la fermentación del kéfir de agua, las levaduras hidrolizan la sacarosa mediante una  $\beta$ -D-fructofuranosidasa extracelular (invertasa), produciendo glucosa y fructosa. Los monosacáridos resultantes de la hidrólisis son incorporados al interior de las células

de levadura a través de difusión facilitada. Una vez dentro, la levadura los metaboliza para obtener energía y como consecuencia produce etanol, que queda disponible en el medio para ser aprovechado por los demás microorganismos del consorcio. A lo largo de la fermentación, el etanol se acumula de manera progresiva y sostenida. No obstante, esta acumulación no es permanente: las bacterias ácido-acéticas presentes en el sistema oxidan el etanol y lo transforman en ácido acético, lo que explica la reducción gradual de su concentración conforme avanza el proceso fermentativo.

A pesar de que las bacterias ácido-lácticas representan la fracción microbiana más numerosa dentro de los gránulos, son las levaduras las que dominan la actividad metabólica durante el desarrollo de la fermentación del kéfir de agua. Investigaciones recientes apuntan a una posible conexión entre el CO<sub>2</sub> que liberan las levaduras y la activación de las bacterias lácticas: en los momentos iniciales del proceso, concentraciones reducidas de este gas favorecerían la proliferación bacteriana, *Lactobacillus hilgardii* es una bacteria ácido-láctica obligadamente heterofermentativa, otros lactobacilos participan activamente en las primeras horas, como *L. casei/paracasei*, *L. hilgardii* y *L. Harbinensis*; responsables de generar ácidos orgánicos que descienden el pH del medio. Estos mismos ácidos, lejos de ser un subproducto inerte, serían reaprovechados por las levaduras como fuente adicional de energía, evidenciando una relación de interdependencia metabólica entre ambos grupos microbianos (de Almeida et al., 2025; Laureys & De Vuyst, 2014; Lynch et al., 2021) .

Por lo que la fermentación del kéfir de agua no responde a un solo tipo metabólico, sino a una combinación que evoluciona en el tiempo; sin embargo, las levaduras inician hidrolizando la sacarosa para que se logre la fermentación heteroláctica (también llamada heterofermentativa), ejecutada por las BAL heterofermentativas (Verge et al., 2019) .

Paralelamente, otras bacterias realizan fermentación homoláctica: los lactobacilos homofermentativos como *L. hordei* convierten los carbohidratos principalmente en ácido láctico a través de la vía Embden-Meyerhof (EMP), mientras que los heterofermentativos producen ácido acético, etanol y dióxido de carbono además de ácido láctico mediante la vía de la fosfoacetolasa (PKP) (Xu et al., 2019).

Simultáneamente, las levaduras llevan adelante la fermentación alcohólica; sin embargo, el nivel de etanol disminuye progresivamente porque las bacterias ácido-acéticas lo convierten en ácido acético durante la fermentación (de Almeida et al., 2025) .

Finalmente, la fermentación que se inicia en el kéfir de agua puede describirse como una fermentación mixta espontánea, donde coexisten fermentación heteroláctica, fermentación homoláctica, fermentación alcohólica y fermentación acética.

#### 4.1. Análisis de Varianza para Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

**Tabla 4**

*Análisis de varianza para bacterias ácido lácticas*

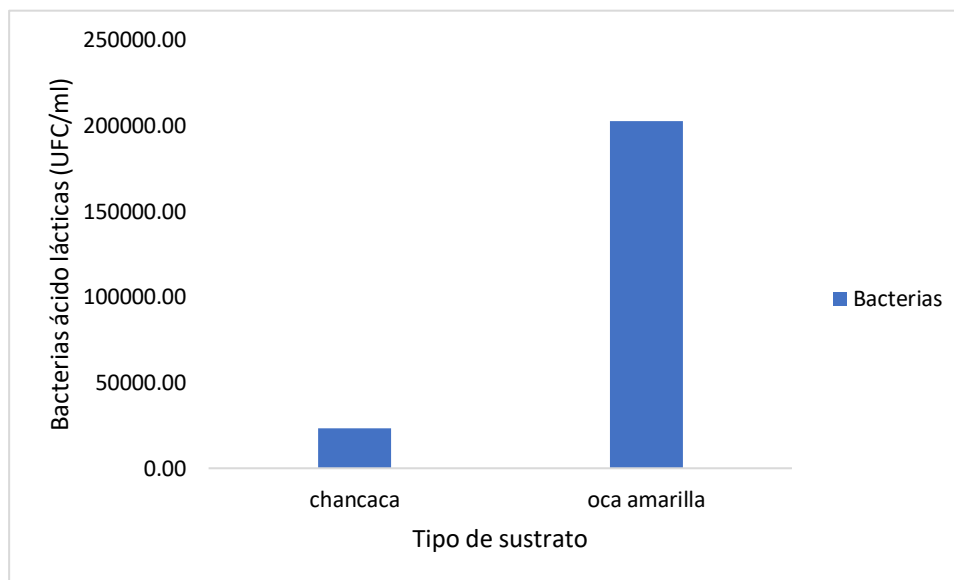
| <b>Fuente</b>              | <b>GL</b> | <b>SC Ajust.</b>      | <b>MC Ajust.</b>      | <b>Valor F</b> | <b>Valor p</b> |
|----------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| A: Sustratos               | 1         | $1.44 \times 10^{11}$ | $1.44 \times 10^{11}$ | 6.51           | 0.025          |
| B: Tiempos de fermentación | 2         | $5.48 \times 10^{10}$ | $2.74 \times 10^{10}$ | 1.24           | 0.324          |
| AB                         | 2         | $3.83 \times 10^{10}$ | $1.91 \times 10^{10}$ | 0.86           | 0.446          |
| Error                      | 12        | $2.66 \times 10^{11}$ | $2.23 \times 10^{10}$ |                |                |
| Total                      | 17        | $5.04 \times 10^{11}$ |                       |                |                |

El análisis de varianza muestra que el factor sustrato tiene un efecto significativo ( $p = 0.025$ ) sobre el crecimiento de BAL, mientras que el tiempo de fermentación ( $p = 0.324$ ) y la interacción entre ambos factores ( $p = 0.446$ ) no presentan significancia estadística. Esto indica que

la respuesta bacteriana depende principalmente del tipo de sustrato utilizado, siendo independiente del tiempo de fermentación dentro del rango evaluado. Estos resultados están en línea con lo reportado por diversos investigadores que los microorganismos dominantes están influenciados por el tipo de sustrato utilizado (Pendón et al., 2022; Teijeiro et al., 2025; Zannini et al., 2022). Esta diferencia puede atribuirse a la composición nutricional de la oca, que según Castañeta et al. (2022), contiene carbohidratos complejos compuestos principalmente por almidón (42.17%) y azúcares totales (9.68%), además de minerales como calcio, hierro, fósforo y zinc. Un aspecto fundamental es que la oca contiene fructooligosacáridos (FOS), compuestos prebióticos que, según Acurio et al. (2023), favorecen selectivamente el crecimiento de BAL al servir como sustrato fermentable preferencial. Estos FOS representan entre 7.27 a 7.61 g por cada 100 g de oca según estudios recientes sobre tubérculos andinos. Por otro lado, la chancaca (panela), aunque compuesta principalmente de sacarosa (91.9-95.5%), glucosa (2.9-4.6%) y fructosa (1.6-3.7%), según Alarcón et al. (2021), presenta menores cantidades de micronutrientes esenciales, además reportan que la panela contiene compuestos fenólicos (0.4-0.6%) y flavonoides (0.2-0.4%), así como minerales en cantidades menores comparadas con la oca amarilla. Esta diferencia en biodisponibilidad de nutrientes, especialmente la presencia de fructooligosacáridos prebióticos en la oca amarilla explicaría el mayor crecimiento de BAL en este sustrato, convirtiendo a este tubérculo andino en un medio más favorable para el desarrollo microbiano durante la fermentación del kéfir de agua.

**Figura 10**

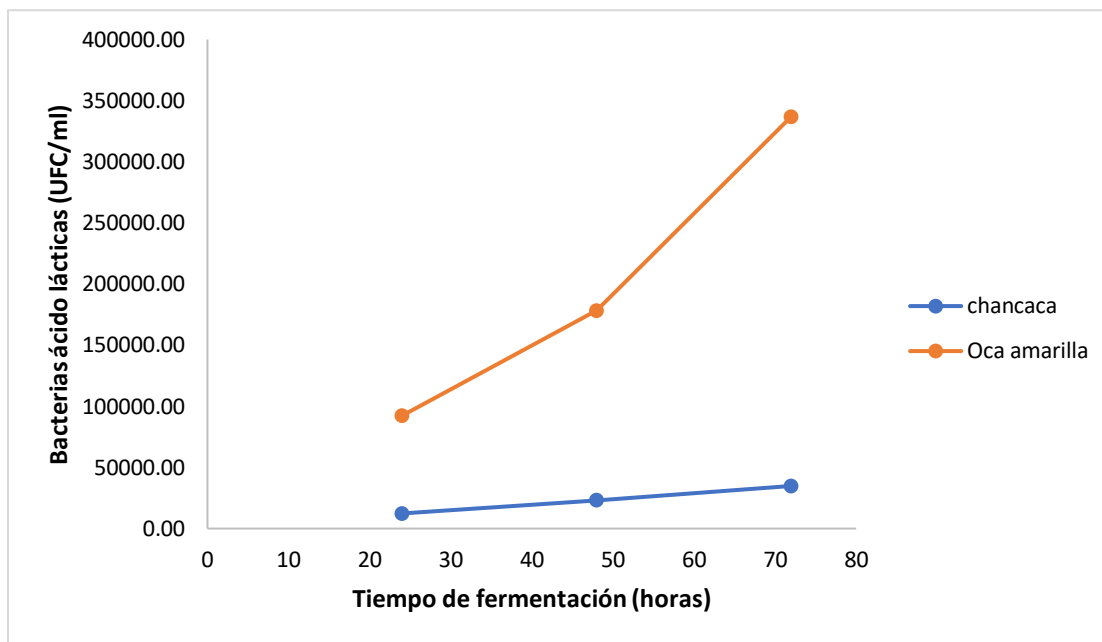
*Recuento de UFC/mL de BAL en muestras de kéfir de agua en función del tipo de sustrato.*



La gráfica 10 compara la población de BAL en función del tipo de sustrato (chancaca y oca amarilla). Se observa que el tipo de sustrato mostró una influencia marcada sobre la población de BAL. La oca amarilla promovió un crecimiento significativamente mayor (promedio mayor a  $2.0 \times 10^5$ ) en comparación con la chancaca (promedio mayor a  $2.0 \times 10^4$ ), evidenciando un incremento de casi un orden de magnitud en los recuentos microbianos, confirmando el efecto significativo detectado en el ANOVA.

**Figura 11**

*Crecimiento de la población de BAL en función del tiempo.*



La figura 11 muestra un incremento sostenido de la población de bacterias ácido lácticas en función del tiempo de fermentación para ambos sustratos; no obstante, la magnitud del crecimiento difiere de manera marcada según el tipo de sustrato. La oca amarilla presenta recuentos significativamente superiores en todos los tiempos evaluados, con un aumento pronunciado entre 24 y 72 h, lo que evidencia una cinética de crecimiento acelerada y una alta capacidad del sustrato para sostener la proliferación de las bacterias. En contraste, la chancaca exhibe un incremento gradual y de menor intensidad, manteniéndose consistentemente en valores inferiores; este comportamiento diferencial sugiere un claro efecto del sustrato y del tiempo de fermentación. En conjunto, los resultados confirman que tanto el tiempo de fermentación como la naturaleza del sustrato son factores determinantes en la dinámica poblacional de las BAL.

Como se puede observar en la figura 11, el recuento de UFC/mL de BAL presenta un incremento a mayor tiempo de fermentación, lo que concuerda con la investigación realizada por

(Laureys et al., 2021) quienes utilizaron higos secos y azúcar de caña sin refinar para fermentar kéfir de agua, obteniendo como resultado promedio de levaduras y BAL fueron de  $6,3 \pm 0,2$  y  $6,9 \pm 0,1$  log UFC  $\text{ml}^{-1}$  de licor de kéfir de agua, un resultado numéricamente superior a lo obtenido en esta investigación, pero esto se puede deber al tiempo de fermentación empleado en dicha investigación, pues este factor fue muy superior a 72 horas, aplicando hasta 192 horas de fermentación; coincidiendo con un estudio realizado en Ayacucho, donde desarrollaron una bebida simbiótica a base de kéfir de agua fermentado con sustratos vegetales andinos: mashua negra, yacón y espirulina, obteniendo recuentos de BAL superiores a 8 log UFC/mL al día 7 de fermentación (Cuba Sosa & Velásquez Ccosi, 2025). Estos resultados reportados reflejan que el tiempo de fermentación (168 horas -192 horas) influye en el recuento elevado de bacterias lácticas en contraste con el tiempo de fermentación de 72 horas realizado en este estudio donde el resultado de BAL fue menor.

En un estudio realizado por Ustaoglu-Gençgönül et al. (2024) determinaron que los kéfirs que utilizaron vegetales como sustrato tuvieron cantidades significativas de BAL, y que la cantidad inicial (término de la fermentación) así como el aumento o disminución durante la fermentación depende del tipo de sustrato, pues las características de cada sustrato afectan estos números, por ejemplo, la cantidad de *Lactobacillus spp.* fue mayor en kéfir producido con almendra como sustrato, pero esta cantidad disminuyó durante el almacenamiento, mientras que el kéfir producido con arroz y garbanzo tuvieron menor cantidad de este microorganismo, pero aumentaron durante el almacenamiento en frío, mientras que *Lactococcus spp.* se detectó en la cantidad más alta con 8,5 log UFC/mL en el kéfir de arroz, pero en el kéfir de almendras y el kéfir de garbanzos fue de 7,73 log UFC/mL y no mostró un aumento significativo durante el almacenamiento en frío.

Mientras que Darvishzadeh et al. (2021) demostraron que la cantidad de BAL en kéfir de agua que utilizó como sustrato a aceitunas rusas fue de solo 7,06 log UFC/mL, es decir menor al kéfir de almendras y arroz, e igual al kéfir de garbanzo, pero un mayor recuento al realizado en este estudio donde utilizamos como sustrato chancaca y oca amarilla.

#### 4.2. Análisis de Varianza para Levaduras

**Tabla 5**

*Análisis de varianza para Levaduras*

| <b>Fuente</b>              | <b>GL</b> | <b>SC Ajust.</b>       | <b>MC Ajust.</b>       | <b>Valor F</b> | <b>Valor p</b> |
|----------------------------|-----------|------------------------|------------------------|----------------|----------------|
| A: Sustratos               | 1         | 2.71 x 10 <sup>9</sup> | 2.71 × 10 <sup>9</sup> | 15.96          | 0.002          |
| B: Tiempos de fermentación | 2         | 3.74 x 10 <sup>9</sup> | 1.87 × 10 <sup>9</sup> | 11.00          | 0.002          |
| AB                         | 2         | 3.22 x 10 <sup>8</sup> | 1.61 × 10 <sup>9</sup> | 0.95           | 0.415          |
| Error                      | 12        | 2.04 x 10 <sup>9</sup> | 1.70 × 10 <sup>9</sup> |                |                |
| Total                      | 17        | 8.82 x 10 <sup>9</sup> |                        |                |                |

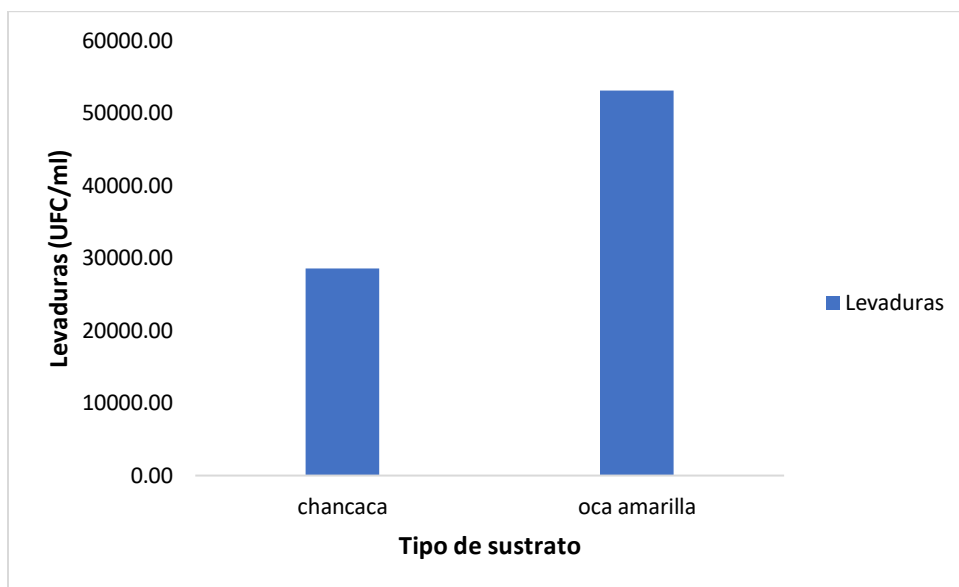
El análisis de varianza para levaduras revela efectos altamente significativos tanto para el tipo de sustrato ( $p = 0.002$ ) como para el tiempo de fermentación ( $p = 0.002$ ), mientras que la interacción entre ambos factores no presenta significancia ( $p = 0.415$ ). Estos resultados indican que el crecimiento de las levaduras está influenciado de manera independiente por el sustrato y la duración de la fermentación.

Las levaduras mostraron un crecimiento significativamente mayor en el sustrato de oca amarilla comparado con la chancaca, con efectos significativos tanto del tipo de sustrato como del tiempo de fermentación; este comportamiento puede explicarse por la compleja composición de carbohidratos de la oca amarilla. Según Acurio et al. (2023), la oca es una fuente esencial de carbohidratos, con almidón representando el 42.17% y azúcares totales el 9.68% de su

composición. Un estudio realizado por Castañeta et al. (2025) confirma que *Oxalis tuberosa* posee propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y nutricionales favorables, incluyendo la presencia de fructooligosacáridos con potencial prebiótico; la presencia de diferentes tipos de azúcares fermentables (sacarosa, glucosa, fructosa) y fructooligosacáridos en la oca proporciona una mayor diversidad de fuentes de carbono para las levaduras, las cuales utilizan estos azúcares tanto en rutas glucolíticas como en el ciclo de ácidos tricarboxílicos, según investigaciones sobre fermentaciones tradicionales. Además, según Castañeta et al. (2022), la oca aporta vitaminas (A, B1, B2, niacina y C) y minerales, nutrientes esenciales para el metabolismo de levaduras. En contraste, la chancaca, siendo principalmente una fuente concentrada de sacarosa, presenta una composición nutricional menos diversa. Según Alarcón et al. (2021), la panela contiene 91.9-95.5% de sacarosa, 2.9-4.6% de glucosa y 1.6-3.7% de fructosa, con menores cantidades de minerales. Esta mayor biodisponibilidad y diversidad nutricional de la oca, especialmente su contenido de almidón fermentable y fructooligosacáridos, explicaría el incremento progresivo más marcado de levaduras observado hasta las 72 horas de fermentación.

## Figura 12

*Recuento de UFC/mL de levaduras en muestras de kéfir de agua en función del tipo de sustrato.*



La Figura 12 compara la población de levaduras en función del tipo de sustrato (chancaca y oca amarilla). Se evidencia que el tipo de sustrato mostró una influencia marcada sobre la población microbiana evaluada. La oca amarilla promovió un crecimiento significativamente mayor (promedio mayor a  $5.0 \times 10^4$ ) en comparación con la chancaca (promedio mayor a  $2.0 \times 10^4$ ), evidenciando un incremento notable en los recuentos microbianos, confirmando el efecto significativo detectado en el análisis de varianza. Esto puede estar influenciado a la mayor disponibilidad de nutrientes de los diferentes sustratos, lo cual es respaldado por Darvishzadeh et al. (2021).

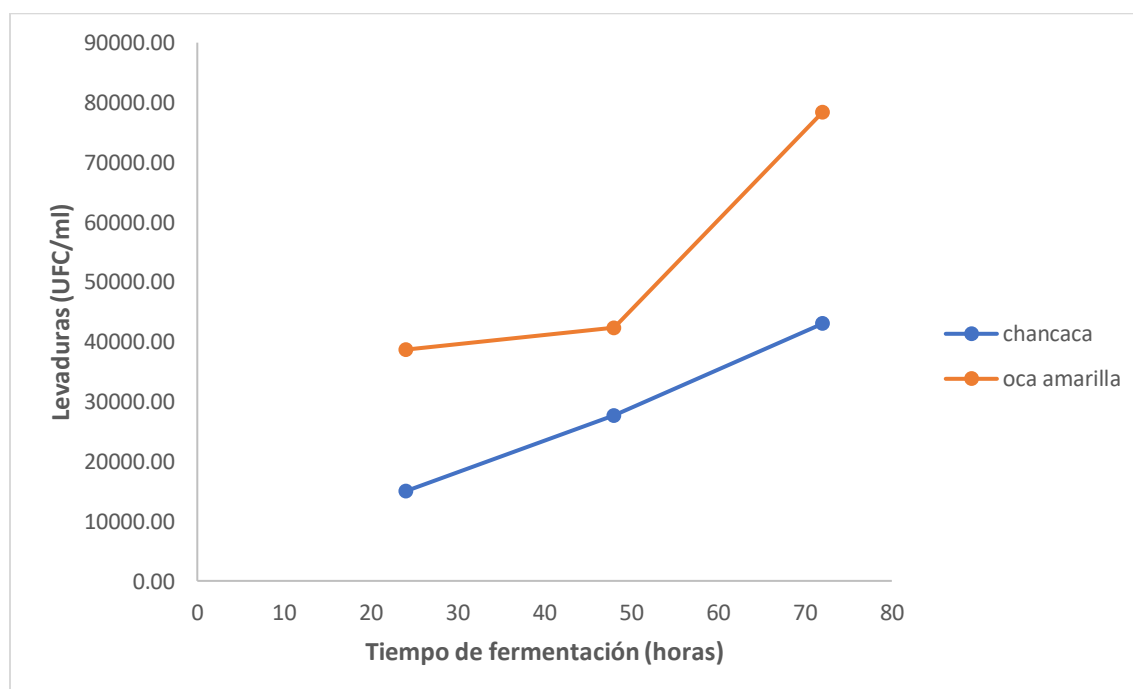
Las levaduras del kéfir de agua se desarrollan preferentemente en condiciones anaerobias o microaerófilas, con temperaturas óptimas entre 20 y 30 °C y un rango de pH entre 4.0 y 6.0, condiciones que favorecen la fermentación alcohólica mediante la conversión de glucosa y fructosa en etanol y CO<sub>2</sub> (Tingirikari et al., 2024; Bozkir et al., 2024). En el presente estudio, la oca amarilla promovió un mayor crecimiento de levaduras (promedio de  $5.0 \times 10^4$  UFC/mL) en

comparación con la chancaca (promedio de  $2.0 \times 10^4$  UFC/mL), valores que se encuentran por debajo de lo reportado por Tingirikari et al. (2024) y Bozkir et al. (2024), diferencia que podría estar asociada a la composición nutricional particular de los sustratos locales empleados.

En general, el recuento y diversidad de levaduras en kéfir de agua parece ser menor que de las bacterias, *Saccharomyces cerevisiae* suele ser un miembro clave de la comunidad microbiana de los gránulos, otras especies se han identificado como *S. florentinus* (*Zygorulasporea florentina*), *S. unisporus* y *S. pretoriensis*; *Candida kefir* y *Kluyveromyces marxianus ssp. marxianus*, sin embargo, las especies dominantes y su prevalencia en los estudios pueden variar según varios factores el origen geográfico de los gránulos de kéfir, que está estrechamente relacionado con las condiciones climáticas, tipo de sustrato, tiempo de fermentación, condiciones de fermentación (Azizi et al., 2021; de Almeida et al., 2025; Lynch et al., 2021).

### Figura 13

*Crecimiento de la población de levaduras en función del tiempo.*



La figura 13 evidencia un incremento progresivo de la población de levaduras conforme avanza el tiempo de fermentación de 24 a 72 horas en ambos sustratos, con evidencias claras en la magnitud del crecimiento según el tipo de sustrato. La oca amarilla presenta recuentos consistentemente superiores en todos los tiempos de fermentación evaluados. Mientras que la chancaca exhibe un crecimiento sostenido, pero de menor intensidad, manteniéndose en niveles inferiores a lo largo del proceso. Este comportamiento indica un efecto significativo para ambos factores. En conjunto, los resultados confirman que la dinámica poblacional de levaduras está fuertemente condicionada tanto por el tiempo de fermentación como por la naturaleza del sustrato, con implicancias relevantes para la estabilidad y el desempeño del ecosistema fermentativo.

Estos resultados difieren con un estudio realizado en Ecuador que utilizando un sustrato de lactosuero bovino y naranja encontraron cantidades menores de levadura ( $1 \times 10^2$  UFC/mL) en un tiempo de fermentación de 24 horas (Aucancela Sánchez et al., 2025); por otro lado, (Monar et al., 2014) encontraron cantidades de levaduras ligeramente elevadas ( $2.8 \times 10^7$  ufc/mL) utilizando como sustrato miel de abeja en un tiempo de fermentación de 48 horas lo que difiere con nuestros resultados, coincidiendo con cantidades similares de levaduras ( $10^6 - 10^7$  UFC/mL) evaluadas en diferentes muestras de kéfir de agua producidas por emprendedores argentinos (De Almeida et al., 2025).

Un estudio realizado por Bozkir et al., (2024), encontraron que la comunidad microbiana cambia con el tiempo durante todo el proceso de fermentación, con un enriquecimiento de grupos microbianos después de 72 horas de fermentación, mostrando los resultados metataxonómicos *P. membranifaciens* como especie dominante entre las levaduras, y con  $4,8 \times 10^7$  CFU/mL frente a  $4,77 \times 10^5$  CFU/mL en niveles máximos y mínimos de concentración de levaduras respectivamente, coincidiendo con otro estudio donde la bebida

resultante de la fermentación de los gránulos de kéfir en agua con azúcar en un tiempo de fermentación de 48 horas obtuvieron un resultado de recuento de levaduras de  $5.9 \times 10^7$  UFC/mL (Mogro Crespín, 2022), estos estudios difieren con los resultado de este trabajo obteniendo un recuento ligeramente elevado en comparación con este estudio.

#### 4.3. Análisis de Varianza para Bacterias Ácido Acéticas (BAA)

**Tabla 6**

*Análisis de varianza para las bacterias ácido acéticas*

| Fuente                     | GL | SC Ajust.          | MC Ajust.          | Valor F | Valor p |
|----------------------------|----|--------------------|--------------------|---------|---------|
| A: Sustratos               | 1  | $1.73 \times 10^8$ | $1.73 \times 10^8$ | 2.20    | 0.164   |
| B: Tiempos de fermentación | 2  | $3.50 \times 10^8$ | $1.75 \times 10^8$ | 2.23    | 0.150   |
| AB                         | 2  | $2.11 \times 10^8$ | $1.05 \times 10^7$ | 1.34    | 0.298   |
| Error                      | 12 | $9.43 \times 10^8$ | $7.86 \times 10^7$ |         |         |
| Total                      | 17 | $1.68 \times 10^9$ |                    |         |         |

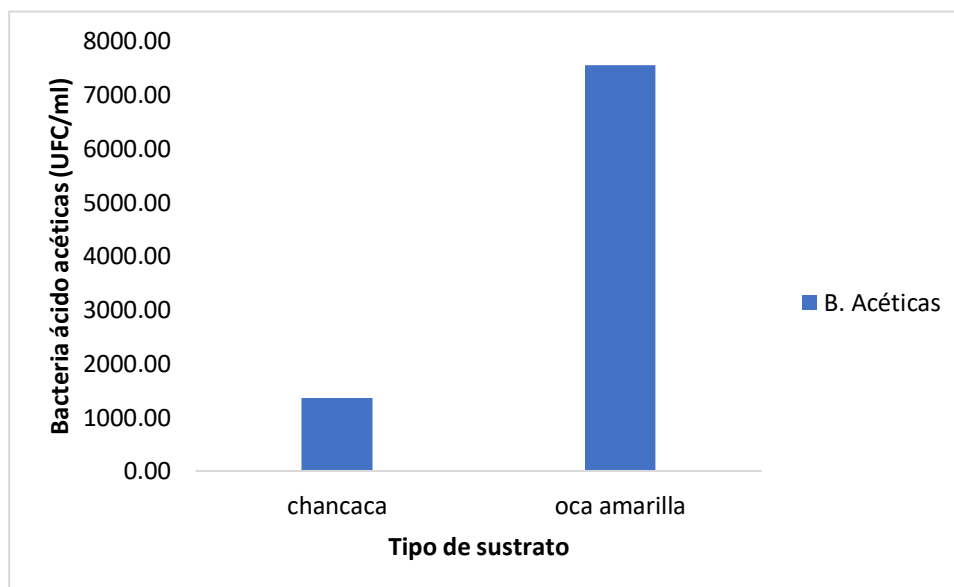
El análisis de varianza para las BAA revela que ni el tipo de sustrato ( $p = 0.164$ ), ni el tiempo de fermentación ( $p = 0.150$ ), ni la interacción entre ambos factores ( $p = 0.298$ ) presentan efectos estadísticamente significativos sobre el crecimiento de las BAA. Lo cual indica que estos factores no influyen en la variable respuesta.

Según Castañeta et al. (2022), la oca aporta minerales esenciales, mientras que Alarcón et al. (2021) reportan que la panela también contiene minerales como calcio (80 mg/100g), magnesio (81 mg/100g), fósforo (68 mg/100g) y hierro (12 mg/100g), aunque en menores cantidades relativas. Las BAA más representativas sería *Acetobacter* sin embargo muchas veces no es detectable. La falta de significancia estadística podría deberse a que estas BAA necesitan el oxígeno para realizar su actividad metabólica. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 y 30 °C, con un pH óptimo de 5.0 a 6.5. En el kéfir de agua, las BAA utilizan

el etanol producido por las levaduras como sustrato principal, oxidándolo a ácido acético mediante la enzima alcohol deshidrogenasa. Este proceso ocurre en dos etapas: primero el etanol es oxidado a acetaldehído, y luego el acetaldehído es oxidado a ácido acético. Dado que su actividad depende directamente de la disponibilidad de oxígeno y de la concentración de etanol en el medio, las BAA actúan en las capas superficiales del kéfir donde el oxígeno es más accesible, y su crecimiento está estrechamente ligado a la actividad previa de las levaduras (Lynch et al., 2021; Bozkir et al., 2024). No obstante, el incremento progresivo observado hasta las 72 horas en ambos sustratos confirma que tanto la oca como la chancaca proveen los nutrientes básicos necesarios para el metabolismo de este grupo microbiano durante la fermentación del kéfir de agua (Lynch et al., 2021).

#### Figura 14

*Recuento de UFC/mL de BAA en muestras de kéfir de agua en función del tipo de sustrato.*

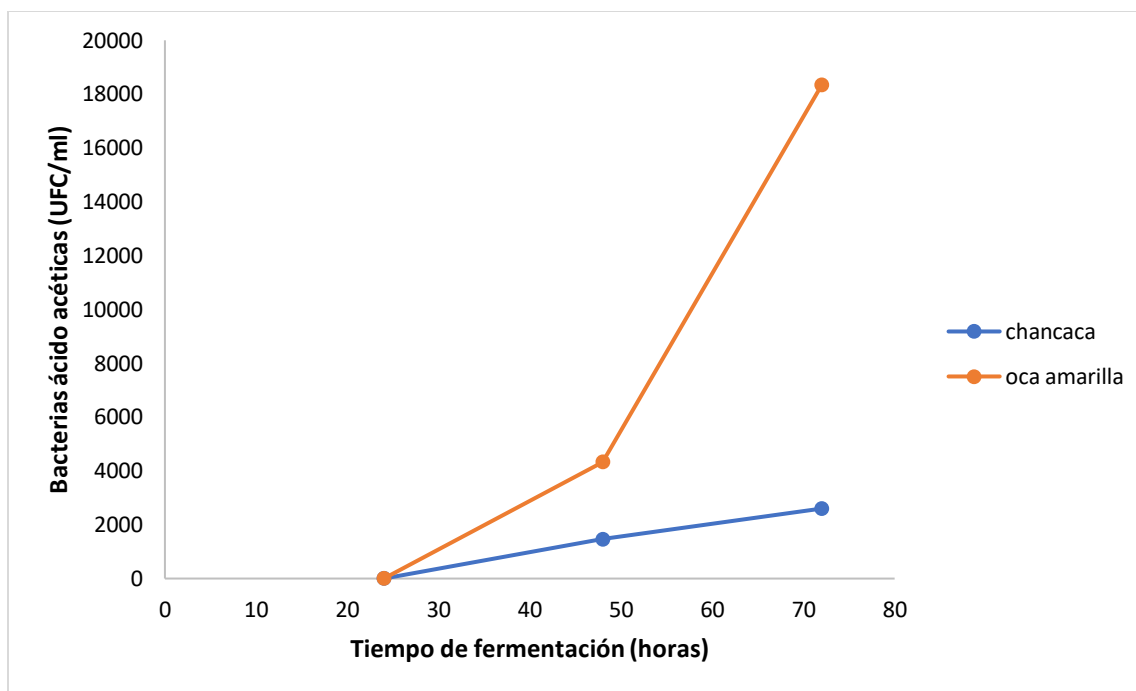


La figura 14 muestra la población de BAA en función del tipo de sustrato (chancaca y oca amarilla). Se observa una tendencia a valores más elevados cuando se emplea oca amarilla en comparación con chancaca, lo que sugiere un efecto aparente del sustrato sobre la concentración

de estas bacterias. No obstante, el análisis de varianza indicó que dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), por lo que no puede afirmarse un efecto significativo del tipo de sustrato sobre la población de BAA bajo las condiciones evaluadas.

### Figura 15

*Crecimiento de la población de BAA en función del tiempo.*



La figura 15 indica la evolución de la población de bacterias ácido acéticas a lo largo del tiempo de fermentación para los sustratos chancaca y oca amarilla. Desde un punto de vista descriptivo, se observa que estas bacterias se incrementan conforme aumenta el tiempo de fermentación en ambos sustratos, siendo mucho más notoria en la oca amarilla, sobre todo a las 72 h. Sin embargo, a pesar de las tendencias observadas en los gráficos, el análisis estadístico indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) ni para la clasificación del tipo de sustrato, ni para la clasificación del tiempo de fermentación, ni para la interacción entre ambos factores, lo que pone de manifiesto que, según las condiciones

evaluadas, las diferencias están muy lejos de ser lo suficientemente notables como para atribuir un efecto significativo a los factores estudiados sobre la población de bacterias ácido acéticas.

Esto sugiere que el crecimiento de las BAA depende más del tiempo de exposición que del tipo de sustrato, y que la oca amarilla podría proporcionar condiciones más favorables para su desarrollo en etapas avanzadas de la fermentación. Esto tiene base en la investigación de (Laureys et al., 2021), quienes encontraron que las BAA fueron cuantificables solamente a largos tiempos de fermentación (a las 144 h y 192 h de fermentación), pues en esta investigación también fueron cuantificables a tiempos de fermentación de 48 horas o superior, estando ausentes a 24 horas de fermentación, estos resultados coinciden con un estudio donde utilizaron como sustrato frutos de olivo ruso, obteniendo mayor número de células para BAA a partir a las 47 horas de fermentación (Darvishzadeh et al., 2021). En contraste, Zannini et al. (2022) determinaron BAA como los microorganismos dominantes, lo cual demuestra que efectivamente el tipo de sustrato es un factor determinante de la viabilidad de los microorganismos presentes en el kéfir de agua, pues en este último estudio se usaron como sustratos a frutas (manzana, pasas e higos). Además, los estudios muestran que la concentración de microorganismos en la bebida de kéfir de agua puede variar debido las condiciones de cultivo, el perfil microbiológico de los granos y los sustratos utilizados, variando la proporción de bacterias acéticas de  $7 \times 10^2$  a  $3.2 \times 10^6$  UFC /mL (De Almeida et al., 2025).

Por otro lado, las variaciones en los recuentos de bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras probablemente se asociarían a la concentración y tipo de azúcar de los sustratos chancaca y oca amarilla, la accesibilidad a nutrientes esenciales como el carbono y el nitrógeno puede promover altos niveles de crecimiento microbiano de bacterias y levaduras (Gül et al., 2023), en una bebida de kéfir formulados a base de miel de abeja obtuvieron mayor

recuento de bacterias ácido lácticas, lo que puede ser debido a que la miel de abeja contiene 29% de glucosa y 38% de fructosa en su composición y solo un 4% de sacarosa, y en el caso de la panela, el porcentaje de azúcares reductores es de 9.15% y de sacarosa 80.91% (Monar et al., 2014), esto explicaría porque en este estudio se obtuvo mayor recuento de bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias ácido acéticas con el sustrato de oca amarilla por la presencia de sólidos solubles y carbohidratos en este, donde un estudio muestra que los sólidos solubles de oca amarilla soleada 12 días se encuentra entre 5.4 - 9.0 °Brix (Castañeta et al., 2022), otros estudios destacan contenido significativo de proteínas, carbohidratos, fibra, y minerales como fósforo, calcio y hierro en la oca (*O. tuberosa*) (Dionicio-Varas et al., 2026; Reyes García et al., 2017). Estos nutrientes promueven el crecimiento de microorganismos responsables de la alta producción de ácido (Gül et al., 2023), lo que sugiere que a partir de las 48 horas de fermentación el kéfir de agua elaborado con sustrato de oca amarilla no tendría un sabor aceptable.

En el kéfir de agua coexisten de forma simbiótica un sistema microbiológico complejo de bacterias y levaduras (Monar et al., 2014; Teijeiro et al., 2025; Vargas & Ruiz, 2024), el cual está influenciado por el tiempo de fermentación, un mayor tiempo de fermentación son óptimos para un crecimiento y viabilidad de BAA y levaduras en comparación con BAL, probablemente puede deberse a la interacción simbiótica entre BAA y levaduras durante la fermentación del kéfir de agua (Darvishzadeh et al., 2021). La presencia de etanol, producido por las células de levadura, facilita el crecimiento de las BAA, pero influye negativamente en el crecimiento de las BAL, esto puede deberse al aumento del etanol; ya que la glucosa es transformada en ácido glucónico y la fructuosa en ácido acético por las BAA, este aumento de producción de ácido

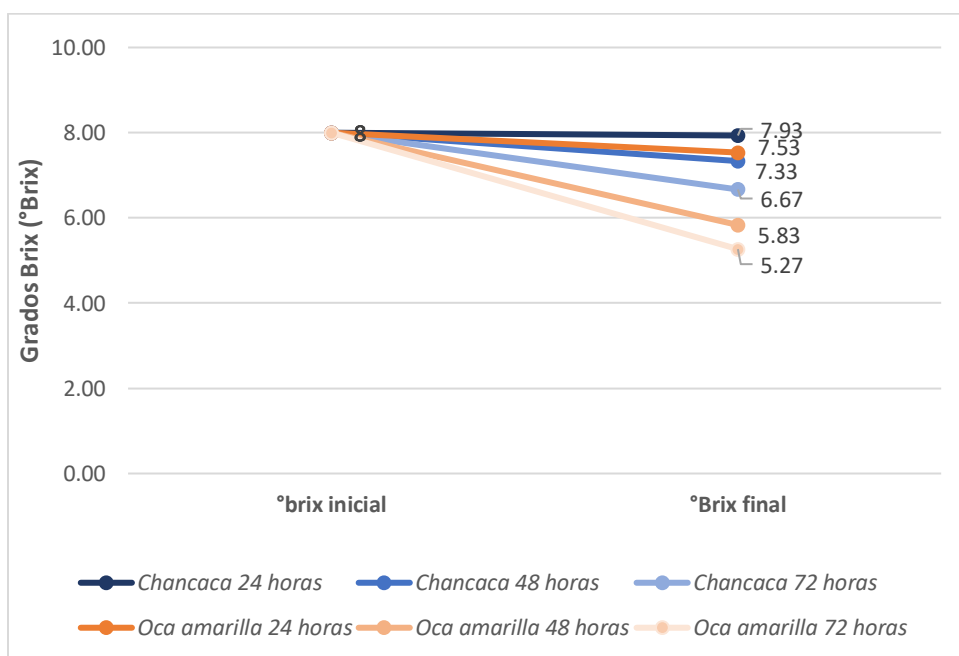
acético estimula a las levaduras a convertir el azúcar y producir etanol a través de la vía metabólica de la glucólisis (Ayed L. et al., 2017).

Pueden existir otras interacciones microbianas durante la fermentación del kéfir; sin embargo, los mecanismos de interacción simbiótica de los microorganismos presentes aún no se conocen bien (Fiorda et al., 2017).

#### 4.4. Comportamiento de °Brix y pH durante la fermentación

**Figura 16**

*Cambio de los grados Brix a lo largo del tiempo (horas).*

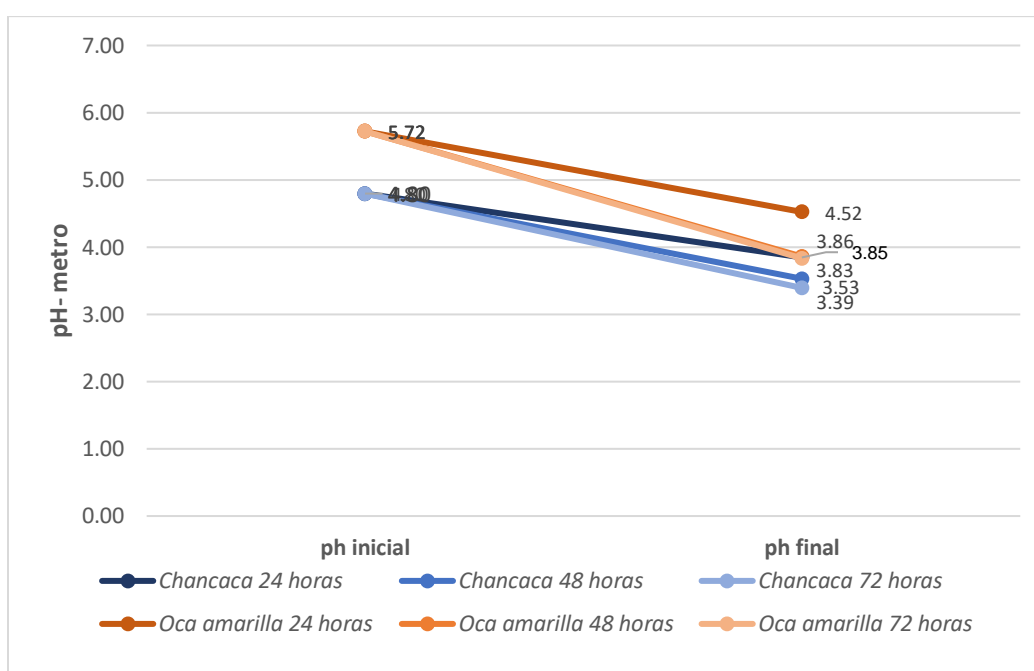


La figura 16 muestra los resultados de concentraciones de azúcar (°Brix); del producto fermentado con sustrato de chancaca durante 24, 48 y 72 horas fue de: 7.93, 7.33 y 6.67 °Brix respectivamente y con sustrato de oca amarilla durante las 24, 48 y 72 horas fue de: 7.53, 5.83 y 5.27 °Brix respectivamente. Durante la fermentación del kéfir de agua, las concentraciones de azúcar disminuyen progresivamente, lo cual se explica porque la sacarosa, al ser el sustrato principal, es hidrolizada en glucosa y fructosa gracias a la enzima invertasa producida por las

levaduras, que van consumiendo estos azúcares a medida que avanza el proceso fermentativo, generando como consecuencia una reducción notable en los sólidos solubles totales de la bebida. (Bozkir et al., 2024). Se informaron resultados similares en estudios previos para bebidas similares al kéfir de agua (Cuba Sosa & Velásquez Ccosi, 2025; Güzel-Seydim et al., 2023; López-Rojo et al., 2017).

### Figura 17

*Cambio del pH a lo largo del tiempo (horas).*



La figura 17 muestra la variación de pH del producto fermentado con sustrato de chancaca durante la fermentación de 24, 48 y 72 horas fue de 3.85, 3.53 y 3.39 respectivamente; y con sustrato de oca amarilla durante 24, 48 y 72 horas fue de 4.52, 3.86 y 3.83 respectivamente. Estos resultados de reducción de pH se explican con el crecimiento de los microorganismos presentes principalmente por BAL, BAA y levaduras que consumen principalmente azúcares presentes en el sustrato y la consecuente producción de etanol, favoreciendo la acidificación del medio (Güzel-Seydim et al., 2023; López-Rojo et al., 2017).

Estos resultados de disminución de pH coinciden con lo reportado por (López-Rojo et al, 2017) utilizando como sustrato agua de piña obteniendo valores de pH a las 48 horas cercanos al 3.5, al igual que Cuba Sosa & Velásquez Ccosi, (2025) quienes realizaron la fermentación con sustratos vegetales en forma de harina, mashua negra y el yacón y espirulina llegando a una disminución hasta valores cercanos a 3,8.

El sustrato oca presentó una mayor tasa de acidificación durante la fermentación, con una caída de pH de 1.89 unidades (de 5.72 a 3.83) en comparación con 1.41 unidades en la chancaca (de 4.80 a 3.39). Esta mayor acidificación está directamente correlacionada con la densidad poblacional de BAL obtenida en la oca amarilla (promedio  $> 2.0 \times 10^5$  UFC/mL), la cual superó significativamente a la de la chancaca (promedio  $> 2.0 \times 10^4$  UFC/mL)

La disminución del pH durante la fermentación del kéfir de agua es causada principalmente por BAL, BAA y levaduras que consumen los azúcares presentes en el sustrato, produciendo ácidos orgánicos como resultado de su actividad metabólica (Cufaoglu & Erdinc, 2023). Estos microorganismos generan diversos compuestos durante la fermentación, como ácido láctico, ácido acético, etanol, manitol, glicerol y otros ácidos orgánicos, los cuales acidifican progresivamente el medio (De Almeida et al., 2025)

Estudios recientes confirman que, durante la fermentación del kéfir de agua, el pH disminuye progresivamente desde valores cercanos a la neutralidad (aproximadamente 6.5-7.0) hasta un rango ácido de 4.0-4.6, dependiendo de la composición microbiana y las condiciones ambientales (Kurniawan et al., 2025).

Asimismo, el consumo de sólidos solubles fue mayor en la oca amarilla, disminuyendo de 8 a 5.27 °Brix ( $\Delta$ Brix = 2.73), en comparación con la chancaca que disminuyó de 8 a 6.67

°Brix ( $\Delta$ Brix = 1.33). Esta mayor utilización de azúcares indica una actividad metabólica más intensa en el sustrato de oca.

Según Bozkir et al. (2024), durante la fermentación del kéfir de agua, las concentraciones de azúcar y sólidos solubles totales (°Brix) cambian; la sacarosa, como sustrato principal, es hidrolizada en glucosa y fructosa mediante la enzima invertasa producida por levaduras, y posteriormente estos monosacáridos son fermentados por BAL y levaduras.

Esatbeyoglu et al. (2023) reportaron que en estudios con kéfir de agua elaborado con jugos de aronia se observó una disminución significativa en el contenido de azúcares después de 72 horas de fermentación, lo que demuestra la eficiente utilización de azúcares por parte de la microbiota del kéfir.

La mayor biodisponibilidad de carbohidratos fermentables en la oca amarilla puede explicarse por su composición química particular. Según Castañeta et al. (2022), la oca contiene almidones (42.17%) que pueden ser parcialmente degradados por enzimas microbianas en azúcares fermentables más simples durante la fermentación, además de los azúcares totales ya presentes (9.68%). Acurio et al. (2023) confirman que la oca contiene fructooligosacáridos, compuestos que actúan como prebióticos y son metabolizados progresivamente por los microorganismos del kéfir de agua. Esta diversidad de fuentes de carbono (almidón, sacarosa, glucosa, fructosa y fructooligosacáridos) en la oca proporciona un sustrato más completo para el consorcio microbiano en comparación con la chancaca, que según Alarcón et al. (2021), está compuesta principalmente de sacarosa (91.9-95.5%), glucosa (2.9-4.6%) y fructosa (1.6-3.7%), presentando una menor diversidad de carbohidratos fermentables.

Es importante mencionar que, aunque el pH final de la oca (3.83) fue superior al de la chancaca (3.39), este valor no fue limitante para el desarrollo microbiano. Por el contrario, la

matriz de la oca parece haber ejercido un efecto amortiguador (buffer) que mantuvo el pH en rangos óptimos para el crecimiento de las BAL. Según estudios recientes sobre kéfir de agua, el pH óptimo para el crecimiento de BAL durante la fermentación se encuentra en el rango de 4.0-4.6 (Kurniawan et al., 2025), y los valores en este rango favorecen la proliferación de microorganismos probióticos mientras inhiben el crecimiento de patógenos. La capacidad buffer de la oca, posiblemente debida a su contenido de minerales como calcio, fósforo y potasio (Castañeta et al., 2022), permitió que el pH se mantuviera en 3.83, dentro de un rango favorable para alcanzar poblaciones con promedio  $> 2.0 \times 10^5$  UFC/mL de BAL. Esto se corrobora con el mayor consumo de sólidos solubles ( $\Delta$ Brix = 2.73) y la mayor actividad metabólica observada en comparación con el sustrato de chancaca, donde a pesar de alcanzar un pH más bajo (3.39), las poblaciones microbianas fueron menores (promedio  $> 2.0 \times 10^4$  UFC/mL).

Estudios recientes sobre fermentación de kéfir de agua con diferentes sustratos han demostrado que la calidad nutricional del sustrato de fermentación, junto con el tiempo de fermentación, afecta significativamente el producto final (Gökırmaklı et al., 2024; Bozkır et al., 2024). En el caso de frutas, se ha reportado que la acidificación observada durante la fermentación y almacenamiento es causada principalmente por BAL, BAA y levaduras que consumen los azúcares presentes en el sustrato (Güzel-Seydim et al., 2023). Otros estudios reportaron que, en kéfir de agua elaborado con mandarina y caqui, el pH disminuyó de 6.02 a 4.07 después de 42 horas de fermentación, valores similares a los observados en este estudio con oca amarilla (Güzel-Seydim et al., 2023). Asimismo, De Almeida et al. (2025) indicaron que, durante la fermentación del kéfir de agua basado en uva, se observó una caída exponencial del pH, observándose descensos desde valores cercanos a 6.5 hasta aproximadamente 4.0 después de

48 horas de fermentación, atribuyendo este descenso principalmente a la actividad metabólica de BAL, BAA y levaduras.

En conjunto, la mayor tasa de acidificación observada en la oca amarilla ( $\Delta\text{pH} = 1.89$ ) correlacionada con el incremento significativo de la población de BAL ( $p = 0.025$ , promedio  $> 2.0 \times 10^5$  UFC/mL) y el mayor consumo de sólidos solubles ( $\Delta\text{Brix} = 2.73$ ), demuestra que la oca actúa como un sustrato altamente biodisponible y metabólicamente favorable para el desarrollo del consorcio microbiano del kéfir de agua artesanal. Estos hallazgos sugieren que la composición química única de la oca, particularmente su contenido de almidón fermentable, azúcares totales, fructooligosacáridos y minerales esenciales, proporciona un medio nutricional superior que favorece el metabolismo vigoroso de los microorganismos en comparación con la chancaca, la cual, a pesar de su alto contenido de sacarosa, presenta una composición nutricional menos diversa y compleja.

## V. CONCLUSIONES

- Se determinó que la microbiota de bacterias ácido lácticas (BAL) del kéfir de agua artesanal está influenciada significativamente por el tipo de sustrato ( $p = 0.025$ ), mas no por el tiempo de fermentación ( $p = 0.324$ ), en ese sentido, la oca amarilla promovió un crecimiento significativamente mayor con un promedio superior a  $2.0 \times 10^5$  UFC/mL en comparación con la chancaca que presentó un promedio superior a  $2.0 \times 10^4$  UFC/mL, evidenciando un incremento de casi un orden de magnitud, con un aumento pronunciado entre 24 y 72 horas en ambos sustratos.
- Se determinó que la microbiota de bacterias ácido acéticas (BAA) del kéfir de agua artesanal no presentó diferencias estadísticamente significativas en función del tipo de sustrato ( $p = 0.164$ ), ni del tiempo de fermentación ( $p = 0.150$ ), ni de la interacción entre ambos factores ( $p = 0.298$ ); a pesar de observarse una tendencia de incremento de la población conforme aumentó el tiempo de fermentación, siendo más notoria en la oca amarilla a las 72 horas, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.
- Se determinó que la microbiota de levaduras del kéfir de agua artesanal está influenciada significativamente tanto por el tipo de sustrato ( $p = 0.002$ ) como por el tiempo de fermentación ( $p = 0.002$ ); al respecto, la oca amarilla promovió un crecimiento significativamente mayor con un promedio superior a  $5.0 \times 10^4$  UFC/mL en comparación con la chancaca que presentó un promedio superior a  $2.0 \times 10^4$  UFC/mL, con un incremento progresivo conforme avanzó el tiempo de fermentación de 24 a 72 horas en ambos sustratos.
- Los parámetros fisicoquímicos disminuyeron progresivamente durante la fermentación. En chancaca, el pH disminuyó 1.41 unidades (de 4.80 a 3.39) y los °Brix disminuyó de 8 a 6.67 °Brix ( $\Delta\text{Brix} = 1.33$ ); en oca amarilla, el pH disminuyó de 5.72 a 3.83 y los °Brix disminuyó de 8 a 5.27 °Brix ( $\Delta\text{Brix} = 2.73$ ), evidenciando la actividad metabólica de los microorganismos durante el proceso fermentativo.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios que evalúen las características organolépticas y la aceptabilidad sensorial del kéfir de agua elaborado con oca amarilla y chancaca, para determinar el tiempo óptimo de fermentación que equilibre tanto la calidad microbiológica como las propiedades sensoriales del producto, complementando los hallazgos microbiológicos obtenidos en este estudio.
- Realizar estudios que identifiquen molecularmente los microorganismos presentes en los nódulos del Kéfir, con la finalidad de entender mejor qué microorganismo están presentes, cómo aprovechan el sustrato y de qué manera influyen en las características fisicoquímicas de la bebida fermentada.
- Evaluar la viabilidad y estabilidad de los microorganismos del kéfir de agua durante el almacenamiento, así como determinar su vida útil bajo diferentes condiciones de conservación, para complementar la información sobre composición microbiana obtenida en este trabajo.
- Se sugiere complementar esta investigación con un estudio donde la variable de salida sea la cinética de crecimiento microbiano durante todo el proceso de fermentación, lo cual ayudará a comprender de manera más completa la dinámica poblacional de los microorganismos involucrados.
- Evaluar la producción de etanol y otros compuestos volátiles generados durante la fermentación del kéfir de agua con chancaca y oca amarilla a tiempos de fermentación mayores a 72 horas, con el fin de establecer hasta qué punto la bebida es segura para su consumo y conocer de manera más completa su composición bioquímica.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acurio, L., Salazar, D., Castillo, B., Santiana, C., Martínez-Monzó, J., & Igual, M. (2023). Characterization of Second-Generation Snacks Manufactured from Andean Tubers and Tuberous Root Flours. *Foods* 2024, Vol. 13, 13(1).  
<https://doi.org/10.3390/foods13010051>
- Aguilar Molina, M. G. (2017). *Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta de producción de panela granulada a partir de caña de azúcar (saccharum officinarum) para el mercado de la región de lima* [Facultad de Ingeniería Industrial, Universidad de Lima].  
[https://repositorio.ulima.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12724/4263/Aguilar\\_%20Molina\\_%20Maiella\\_Geraldine\\_T.pdf?sequence=1](https://repositorio.ulima.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12724/4263/Aguilar_%20Molina_%20Maiella_Geraldine_T.pdf?sequence=1)
- Alarcón, A. L., Palacios, L. M., Osorio, C., César Narváez, P., Heredia, F. J., Orjuela, A., & Hernanz, D. (2021). Chemical characteristics and colorimetric properties of non-centrifugal cane sugar (“panela”) obtained via different processing technologies. *Food Chemistry*, 340, 128183. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128183>
- Ambrocio Ríos, J. A. (2018). *Ecología de levaduras asociadas a la taberna, bebida extraída de la palma de coyol (Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart.)* [Tesis de maestría, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas].
- APHA (2015). American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. *Fifth edition*, 2015, chapter 3, 3.10-3.101 pages 36-37.
- Arias Santos, K. (agosto de 2024). *Utilización de bebidas vegetales de zapallo (Cucurbita moschata Duchesne) y de zambo (Cucurbita ficifolia Bouché) en la producción de*

- helados con propiedades probióticas*. Ambato – Ecuador: Universidad Técnica de Ambato. Obtenido de Facultad De Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología: <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/03bc8e47-a918-4347-810e-71f5f5ae6c23/content>.
- Arteaga, D., Chacón, L., Samamé, V., Valverde, D., & Paucar, L. (2022). Mashua (*tropaeolum tuberosum*): Composición nutricional, características químicas, compuestos bioactivos y propiedades beneficiosas para la salud. *Agroindustrial Science*, 12(1), 95-101.
- Astudillo, M. (2024). *Evaluación de la adición de sirope de mamey Pouteria sapota en yogurt* (Bachelor's thesis, babahoyo: utb, 2024).
- Aucancela Sánchez, S. P., Vernaza Escobar, K. P., & Tutiven Ronquillo, J. A. (2025). Influencia de la concentración y tiempo de fermentación del kéfir en una bebida probiótica a base de lactosuero bovino y naranja. *Cadernos Latino-Americanos de Engenharia, Tecnologia e Ciências Aplicadas*, 4(1), 9–13. <https://doi.org/10.56183/cladetec.v4i1.639>
- Ayed L.; Ben Abid S.; Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology*, 67(1), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>.
- Azizi, N. F., Kumar, M. R., Yeap, S. K., Abdullah, J. O., Khalid, M., Omar, A. R., Osman, M. A., Mortadza, S. A. S., & Alitheen, N. B. (2021). Kefir and Its Biological Activities. *Foods*, 10(6), 1210. <https://doi.org/10.3390/foods10061210>
- Berzero, M. (2015). Ingredientes básicos de la gastronomía. El azúcar.
- Blanco Paz, A. J. (2016). Modelamiento *cinético de la fermentación alcohólica de miel de abejas a diferentes escalas de producción* [Tesis doctoral].

- Bozkir, E., Yilmaz, B., Sharma, H., Esatbeyoglu, T., & Ozogul, F. (2024). Challenges in water kefir production and limitations in human consumption: A comprehensive review of current knowledge. In *Heliyon* (Vol. 10, Number 13). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33501>
- Carrillo Rios, A. (2014). *Modelo de cadena logística de materiales para la exportación de panela (chancaca) granulada al mercado de Reino Unido por parte de la asociación de cañicultores de Pastaza Asocap para el año 2014*. Tesis de Grado, Escuela superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba- Ecuador
- Castañeta, G., Castañeta, R., & Peñarrieta, J. M. (2022). Cambios fisicoquímicos por exposición a la radiación solar en tubérculos de *oxalis tuberosa*, “oca” cultivados en Bolivia. *Revista Boliviana de Química*, 39(2), 44–55.  
<https://www.redalyc.org/journal/4263/426372588003/html/>
- Castañeta, G., Miranda Flores, D., Bustos, A. S., García, R., Loayza, E., Carrasco, C., Tejada, L., Cabrerizo, F. M., & Peñarrieta, J. M. (2025). Influence of Sunlight Exposure and Traditional Dehydration on Chemical and Nutritional Properties of *Oxalis tuberosa* (oca) Tubers. *Plant Foods for Human Nutrition* 2025, 80(2), 91.  
<https://doi.org/10.1007/s11130-025-01330-x>
- Castellanos Rozo, J. (2020). *Biodiversidad bacteriana del queso Paipa, selección de bacterias ácido lácticas y caracterización de sus compuestos antibacterianos*.
- Castillo, N., Durán, Y., Rosero, J., & Pardo, L. (2022). Optimización de la hidrólisis enzimática de la fracción sólida del mucílago de café. Nuevo Panorama de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación. Universidad Ean. <https://www.universidadean.edu.com>

- Castro, L. Á., & De Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37(4), 308–314. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1657-95342006000400009&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342006000400009&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Chávez, L. (2024). Efecto de la temperatura y concentración de ácido cítrico en la calidad fisicoquímica y sensorial de la oca (*Oxalis tuberosa*) variedad amarilla mínimamente procesada.
- Chimba, E., & Muso, P. (2020). *Evaluación y caracterización de ácidos orgánicos presentes en tres Bebidas Ancestrales de Yuca (manihot esculenta crantz) fermentadas con Kéfir y Levadura (saccharomyces cerevisiae)* (Bachelor's thesis, Ecuador, Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi UTC.).
- Chirinos, R., Betalleluz-Pallardel, I., Huamán, A., Arbizu, C., Pedreschi, R., & Campos, D. (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa Mol.*) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 113(4), 1243–1251. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.015>
- Choque Espinoza, M. K., Paredes Gutiérrez, A. S., Pinto Larrea, M. J., Ramos Quispe, L. J., y Silva Meingochea, J. E. (2019). Proyecto de bebida fermentada natural Biokef.
- Chuquilín Goicochea, R. C., Martínez Laurente, M. C., & Rodrigo-Chumbes, J. T. (2020). Propiedades funcionales de productos tradicionales congelados y secados al sol de oca (*Oxalis tuberosa Molina*) y olluco (*Ullucus tuberosus Caldas*): Una revisión. *Puriq*, 2(3), 247–263. <https://doi.org/10.37073/puriq.2.3.100>
- Cia, L. S. (2024). Formulación y Análisis de la Composición de Bebida Realizada a Base de Kéfir de Agua [Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias]. In

*Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias.*

<https://doi.org/https://bdigital.uncu.edu.ar/20205>

Ciappini, M. C., Stoppani, F. S., Martinet, R., & Álvarez, M. B. (2013). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 19, 45-51.

Clavijo Koc, C. V. (2021). *Propuesta de un método de fermentación aplicando microorganismos nativos y cloruro de sodio para manipular la acidez de la aceituna negra natural* [Tesis de maestría].

Cuba Sosa, L. A., & Velásquez Ccosi, P. F. (2025). Desarrollo de una bebida fermentada de kéfir no lácteo a base de sustratos vegetales. *Ingeniería Investiga*, 7.

<https://doi.org/10.47796/ing.v7i00.1214>

Da Anunciação, T. A., Silva Guedes, J. D., Guimarães Tavares, P. P. L., de Melo Borges, F. E., Diego Ferreira, D., Vieira Costa, J. A., Umsza-Guez, M. A., & Magalhães-Guedes, K. T. (2024). Biological Significance of Probiotic Microorganisms from Kefir and Kombucha: A Review. *Microorganisms* 2024, Vol. 12, 12(6).

<https://doi.org/10.3390/microorganisms12061127>

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. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02563-1>

De Almeida, K. V., Sant' Ana, C. T., Wichello, S. P., Louzada, G. E., Verruck, S., & Teixeira, L. J. Q. (2025). Water Kefir: Review of Microbial Diversity, Potential Health Benefits, and

- Fermentation Process. *Processes* 2025, Vol. 13, Page 885, 13(3), 885.  
<https://doi.org/10.3390/PR13030885>
- DIGESA. (2010). *Recomendaciones para el uso de agua segura / DIGESA*. Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria.  
[https://www.digesa.minsa.gob.pe/material\\_educativo/poblacion/agua\\_segura.asp](https://www.digesa.minsa.gob.pe/material_educativo/poblacion/agua_segura.asp)
- Dikmetas, D., Acar, E., Ceylan, F., İlkadım, F., Özer, H., & Guler, F. (2024). Functional fermented fruit juice production and characterization by using water kefir grains. *Journal of Food Science and Technology*. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s13197-025-06209-y>
- Dilas, J., & Ascurra, D. (2020). Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) cultivo subutilizado con alto potencial para zonas altoandinas en el Perú. *Alpha Centauri*, 1(1), 15-24.
- Dionicio Varas, E., Boñon-Rocha, E., Llontop-Ayasta, N., Rojas-Naccha, J. C., & Vásquez-Villalobos, V. J. (2026). Oca (*Oxalis tuberosa*): Nutritive and functional properties. Oxalate content and its influence on humans. *Agroindustrial Science*, 16(1), 165–174.  
<https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2026.01.16>
- Dorantes-Fuertes, M. G., López-Méndez, M. C., Martínez-Castellanos, G., Meléndez-Armenta, R. Á., & Jiménez-Martínez, H. E. (2024). Starch Extraction Methods in Tubers and Roots: A Systematic Review. *Agronomy* 2024, Vol. 14, Page 865, 14(4), 865.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy14040865>
- Epstein, E., & Velazco, M. (2020). *Conocimiento, grado de satisfacción y aceptación de kéfir elaborado con agua y de kéfir elaborado con leche de vaca* [Tesis doctoral, Universidad de Concepción del Uruguay].

- Esatbeyoglu, T., Fischer, A., Legler, A. D. S., Oner, M. E., Wolken, H. F., Köpsel, M., Ozogul, Y., Gülsün, Gülsün ozyurt, G., De Biase, D., & Ozogul, F. (2023). Physical, chemical, and sensory properties of water kefir produced from Aronia melanocarpa juice and pomace. *Food Chemistry: X*, 18, 100683. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100683>
- Fernández, S. F. (2022). *Caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL) para la producción de ácido láctico (AL) a escala de planta piloto* [Tesis doctoral, Universidad de Costa Rica].
- Ferreira da Silva Rocha, A. R. (2024). *Microbiota de kombuchas brasileñas y relación con su actividad biológica in vitro*. Viçosa - Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa.
- Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation: A review. *Food Microbiology*, 66, 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>
- Garcia, I. (2024). Relación entre sustrato, Biomasa y Producto en la Dinámica de Crecimiento de Microorganismos en Términos de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias de Primer Orden.
- Gamarra Mendoza, N., Girón, C., Roque Lima, B., & Díaz Romero, J. (2022). Evaluación del contenido de antocianinas de tres accesiones de oca (*oxalis tuberosa*) en condiciones frescas y cocidas del departamento de Junín. *Prospectiva Universitaria*, 8(2), 13–18. <https://doi.org/10.26490/uncp.prospectivauniversitaria.2011.8.1264>
- Grández Armas, L. (2003). *Mejoramiento tecnológico en la elaboración de chancaca y evaluación de empaques en el almacenamiento* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de San Martín, Facultad de Ingeniería Agroindustrial]. Tarapoto, Perú.

- Grover Castañeta; Ruddy Castañeta; J. Mauricio Peñarrieta. (2022). Cambios físico-químicos por exposición a la radiación solar en tubérculos de oxalis tuberosa, “oca” cultivados en Bolivia. *Revista Boliviana de Química*, 39(2), 44–55.  
<https://www.redalyc.org/journal/4263/426372588003/html/>
- Gökırmaklı, Ç., Şatır, G., & Guzel-Seydim, Z. B. (2024). Microbial viability and nutritional content of water kefir grains under different storage conditions. *Food Science & Nutrition*, 12(6), 4143. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4074>
- Guerrero Jaramillo, E. J., & Oblitas coronel, K. A. (2024). *Producción de sustancias antioxidantes en bebidas fermentadas y su comparación con la producción de bebidas kefiradas. una revisión* [Universidad Nacional de Jaén].  
<http://repositorio.unj.edu.pe/handle/UNJ/681>
- Gualoto, J. (2021). Evaluación nutricional de la oca, mashua, quinua y avena para su uso en la elaboración de muesli.
- Gutiérrez-Mosquera, L. F., Arias-Giraldo, S., & Ceballos-Peñaloza, A. M. (2018). *Energy and Productivity Yield Assessment of a Traditional Furnace for Noncentrifugal Brown Sugar (Panela) Production*. <https://doi.org/10.1155/2018/6841975>
- Gül, L. B., Bekbay, S., Akgün, A., & Gül, O. (2023b). Effect of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour addition combined with high-pressure homogenization on the acidification kinetics, physicochemical, functional, and rheological properties of kefir. *Food Science and Nutrition*, 11(9), 5325–5337. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3491>
- 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.  
<https://doi.org/10.1002/fsn3.3561>

- Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340-346.
- Hernández, H. A., & Giles, M. (2021). *Métodos Microbiológicos para el Análisis de Alimentos*. Editorial Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Hidalgo Guerrero, R. A. (2023). *Evaluación del kéfir de agua con tres sustratos edulcorantes y tres saborizantes naturales*.
- ICMSF (1983). International commission on microbiological Specifications for foods. Microorganismos de los Alimentos 1. Su significado y métodos de enumeración. 2 da Ed. Vol.1, parte II, Pág. 166-167 (Traducción de la versión original 1978) Reimpresión 2000. Editorial Acribia.
- INACAL. (2020, April 6). *Guía para la limpieza y desinfección de manos y superficies*. [https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/2/not/inacal-pone-disposicion-ntp-mascarillas/files/Guia\\_Normalizacion.pdf](https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/2/not/inacal-pone-disposicion-ntp-mascarillas/files/Guia_Normalizacion.pdf)
- Kombucha Perú. (8 de Dic. de 2023). *Fermentos y kombucha Perú SAC*. Obtenido de Una guía paso a paso para preparar Kéfir de agua: <https://www.kombuchaperu.com/post/c%C3%B3mo-preparar-k%C3%A9fir-de-agua-una-gu%C3%ADa-paso-a-paso-para-preparar-k%C3%A9fir-de-agua-en-casa>.
- Kurniawan, Milanda, T., & Kusuma, S. A. F. (2025). Kefir as a functional probiotic: microbial composition and health effects. *Frontiers in Food Science and Technology*, 5, 1725280. <https://doi.org/10.3389/frfst.2025.1725280>
- Latife Betül Gül; Saya Bekbay; Abdullah Akgün; Osman Gül. (2023). Effect of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour addition combined with high-pressure homogenization

on the acidification kinetics, physicochemical, functional, and rheological properties of kefir. *Food Sci Nutr*, *11*(9), 5325–5337.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10494617/>

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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02876>

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. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>

Laureys, D., Leroy, F., Hauffman, T., Raes, M., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2021). The Type and Concentration of Inoculum and Substrate as Well as the Presence of Oxygen Impact the Water Kefir Fermentation Process. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 628599. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628599>

Ledesma, N. A. (2022). Usos y propiedades del yacón (*Smallanthus sonchifolius*) como *alimento funcional y posible empleo como sustrato para fermentar kéfir de agua* [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata].

Limbad, M., Hamid, N., Kantono, K., & Gutierrez Maddox, N. (2024). Functional Properties of Microorganisms Isolated from Formulated Sourdough, Coconut Water Kefir, and Kefir. (Ł. Łopusiewicz, Ed.) *Fermentation*, 327.

Londero, A. (2012). *Alimentos funcionales: obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kéfir* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

- López-Rojo, J. P., García-Pinilla, S., Hernández-Sánchez, H., & Cornejo-Mazón, M. (2017). Estudio de la fermentación de kéfir de agua de piña con tibicos. *Mexicana de Ingeniería Química*, 16(2), 405–414. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62052087007.pdf>
- Lorenzo, O. N. A. (2021). *Efecto del mucílago de cacao (Theobroma cacao) en la fermentación de leche entera en las características del yogurt saborizado con café (Coffea arabica)* [Tesis doctoral, Universidad Agraria del Ecuador].
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>
- Marcia Palma, E. M., & Malespín Rocha, J. M. (2013). *Estudio de la Fermentación Láctica para la Recuperación de Quitina a partir de Desechos de Camarón y Langostino* [Universidad Nacional de Ingeniería]. <https://ribuni.uni.edu.ni/820/1/38797.pdf>
- María Reyes García; Iván Gómez-Sánchez Prieto; Cecilia Espinoza Barrientos. (2017). *Tablas peruanas de composición de alimentos*.
- Medina, P. (2013). *Evaluación de la calidad microbiológica, fisicoquímica y los microorganismos probióticos en productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán, Jalisco*. Eikasias.
- Meyhuay, M. (2001). *Potato: Post-harvest operations*. [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/inpho/docs/Post\\_Harvest\\_Compedium\\_-\\_Potato.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compedium_-_Potato.pdf)
- Miguel, M.; Cardoso, P.; Magalhães, K.; Schwan, R. 2011. “Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States”. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 27 (1):1875–1884.

- Mogro Crespín, S.; G. G. K.; O. R. H. (2022). Estudio del kéfir de agua como base para bebidas carbonatadas. *Agropecuaria*, 10(2).
- Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., & Ramírez-Cárdenas, L. (2014). Chemical and microbiological characterization of Ecuadorian homemade water kefir Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. *Avances En Ciencias e Ingenierías*, 6, 60–66. <http://avances.usfq.edu.ec>
- Montero Balvoa, L. M. (2021). *Características de una bebida fermentada elaborada con kéfir*.
- Mor Llombart, P. (2021). *Evaluación del impacto del proceso de fermentación en estado sólido con Pleurotus ostreatus en las propiedades de la quinoa* [Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València].
- 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(3), 100123. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>
- Navia Orces, A. A., & Pazmiño Piedra, N. V. (2015). *Mejoramiento de las características sensoriales del cacao CCN51 a través de la adición de enzimas durante el proceso de fermentación* [Tesis de licenciatura, ESPOL].
- Obando, P. (2010). *La panela, valor nutricional y su importancia en la gastronomía*. Universidad Técnica del Norte Facultad Ciencias de la Salud, Tecnología en Gastronomía.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105.

- [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612010000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Paredez, A. (2023). Evaluación del brotamiento y compuestos bioactivos de tres variedades de oca (*Oxalis tuberosa*) durante el almacenamiento postcosecha.
- Pascual, M.A. & Calderón, V. (2000). *Microbiología Alimentaria, Metodología analítica para alimentos y bebidas* Editorial Díaz de Santos, S. A. Juan Bravo, 3-A 28006 Madrid (España).
- Pedraza Morales, Y. S., & Ramírez Navas, J. S. (2019). *Caracterización fisicoquímica, sensorial y micológica del kéfir de agua en jugos de frutas tropicales*. Universidad Santiago de Cali.
- 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.  
<https://doi.org/10.1111/JAM.15385>
- Peralvo, M. (23 de febrero de 2014). Información de la Panela.
- Pihurov, M., Păcularu-Burada, B., Cotârleț, M., Vasile, M. A., & Bahrin, G. E. (2021). Novel Insights for Metabiotics Production by Using Artisanal Probiotic Cultures. *Microorganisms* *2021*, Vol. 9, 9(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112184>
- Pizard, M. (2022). *Conservas: Fermentados, escabeches, salsas, confituras, licores y más*. GR. Ilustrados.
- Ramirez Huaman, A. (2020). *Actividad metabólica, viabilidad y exopolisacáridos de bacterias lácticas de granos de Kéfir liofilizado con potencial tecnológico en la región central*.  
<http://hdl.handle.net/20.500.12894/6122>

- Ramírez Restrepo, Y. A., & González Álvarez, D. (2024). *Potencial terapéutico de la kombucha en enfermedades gastrointestinales a través de su interacción con el microbiota intestinal: una revisión sistemática exploratoria*.
- Reyes García, M. M., Gómez-Sánchez Prieto, I., & Espinoza Barrientos, C. M. (2017). *Tablas peruanas de composición de alimentos* (10th ed.). Instituto Nacional de Salud.  
<https://hdl.handle.net/20.500.14196/1034>
- Rodas Huamán, D. S. (2019). *Efecto del porcentaje de gránulos de kéfir y temperatura de incubación en la elaboración de una bebida funcional*.
- Rodríguez, M. A., Fernández, L. A., Díaz, M. L., Pérez, M., Corona, M., & Reynaldi, F. J. (2023). Microbiological and chemical characterization of water kefir: an innovative source of potential probiotics for bee nutrition. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(2), 176-180.
- Roncal, R. (2020). *Propuesta de mejora de una planta productora de chancaca en la provincia de Cajabamba utilizando la metodología Six Sigma para incrementar su productividad* [Trabajo de investigación para optar al grado de Bachiller en Ingeniería Industrial, Universidad Privada del Norte].  
<https://repositorio.upn.edu.pe/bitstream/handle/11537/23457>
- Saboya, D. S. P., Lacheros, S., & Serrato, J. C. (2024). Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de un clúster de microorganismos nativos de una biorrefinería colombiana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 26(2), 8.
- Sánchez, M. T., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharmaceutica*, 56(1). <https://doi.org/10.4321/S2340-98942015000100007>

- Sanchez, S., & Andreas, J. (2020). *Tome su salud en sus manos: ¡Suba Su Sistema Inmune en 14 Pasos y Obtenga su peso ideal de forma natural! Libere su poder mental!*. Siboney Sanchez.
- Taype Ramos, J. A. (2023). *Formulación de una bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón*.
- Teijeiro, M., Abraham, A. G., Cabrera, J., Suchowlanski, G. A., Losada, A., Ruarte, S., López, M., & Vinderola, G. (2025). Análisis de muestras de kéfir de agua para el desarrollo de un marco regulatorio en el Código Alimentario Argentino. *Revista Argentina de Microbiología / Argentinean Journal of Microbiology*, 57(3), 298–303.  
<https://doi.org/10.1016/J.RAM.2025.02.002>
- Tingirikari, J. M. R., Sharma, A., & Lee, H. J. (2024). Kefir: a fermented plethora of symbiotic microbiome and health. *Journal of Ethnic Foods* 2024 11:1, 11(1), 35-.  
<https://doi.org/10.1186/s42779-024-00252-4>
- Ustaoglu-Gençgönül, M., Gökırmaklı, Ç., Üçgül, B., Karagül-Yüceer, Y., & Guzel-Seydim, Z. B. (2024). Chemical, microbial, and volatile compounds of water kefir beverages made from chickpea, almond, and rice extracts. *European Food Research and Technology* 2024 250:8, 250(8), 2233–2244. <https://doi.org/10.1007/s00217-024-04533-9>
- Vandevenne, C. A., & Ribes, M. E. (2002). *Métodos de análisis microbiológicos de alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
- Vargas Sara A.; Ruiz Espinosa H. (2024). Kéfir de agua: Características, producción y fabricación de biopelículas como una alternativa de uso de excedentes. Revisión. Water kefir: Characteristics, production, and manufacturing of biofilms as an alternative use of surplus. Review. *BioTecnología*, 28(1), 36.

- Verce, M., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2019). Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 479. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>
- Villanueva C., M., & Soria T., J. (2022). *Mazamorra a base de Manihot esculenta (yuca) y Ananas comosus (piña), endulzado con Saccharum officinarum (chancaca de caña de azúcar)*. Tesis, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos - Perú.
- Waldherr, F.; Doll, V.; Meissner, D.; Vogel, R. 2010. "Identification and characterization of a glucanproducing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir". *Food Microbiology*, 27(5):672–678.
- Xu, D., Bechtner, J., Behr, J., Eisenbach, L., Geißler, A. J., & Vogel, R. F. (2019). Lifestyle of *Lactobacillus hordei* isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.004>
- 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* 2023, Vol. 9, Page 28, 9(1), 28. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010028>

## VIII. ANEXOS

## Anexo A: Matriz de Operacionalización de las Variables

| Variables                | Dimensiones                     | Definición conceptual   | Indicadores   | Método de medición  | Instrumentos  |
|--------------------------|---------------------------------|---|---|---|---|
| Variables independientes | Sustratos                       | En el kéfir de agua, los sustratos como azúcar morena, chancaca, miel y extractos vegetales, son esenciales como fuente de energía para los microorganismos durante la fermentación, influenciando la composición microbiana y las propiedades del producto final. (Ledesma, 2022).   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Oca amarilla</li> <li>- Chancaca</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Preparación de soluciones con los sustratos.</li> <li>- Medición de °Brix</li> </ul>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Balanza</li> <li>- Refractómetro</li> </ul>  |
|                          | Tiempo de fermentación          | Durante el periodo de fermentación, los microorganismos metabolizan los azúcares del sustrato para producir ácidos, etanol y otros compuestos, influyendo en la acidez, el contenido microbiano y las propiedades del kéfir de agua, siendo crucial para el proceso de elaboración y las propiedades finales del producto (García, 2024). | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 24 horas</li> <li>- 48 horas</li> <li>- 72 horas</li> </ul>                                    | Control del tiempo de fermentación mediante cronómetro y registros de tiempo de fermentación                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cronómetro</li> <li>- Registro de tiempo</li> </ul>  |
| Variables dependientes   | Características microbiológicas | Examina la composición, variedad y función de los microorganismos, como en el kéfir de agua, donde se analizan bacterias y levaduras con técnicas microbiológicas y moleculares para determinar su viabilidad, seguridad y beneficios probióticos. (Medina, 2013)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacterias ácido lácticas.</li> <li>- Bacterias ácido acéticas.</li> <li>- Levaduras</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Método de recuento de colonias (UFC).</li> <li>- Técnica de siembra en placa.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Placas Petri</li> <li>- Medio Selectivo para microorganismos.</li> <li>- Incubadora a temperatura controlada.</li> </ul> |

**Anexo B: Panel fotográfico*****Anexo B1: Disolución de la chancaca*****Figura B1.1:** recepción de la proveniente de la provincia de Cajabamba.**Figura B1.2:** peso de la chancaca.**Figura B1.3:** medición del agua de mesa para la disolución.**Figura B1.4:** disolución de la chancaca.**Figura B1.5:** filtrado de la disolución de la chancaca utilizando tela fina.**Figura B1.6:** análisis de pH**Figura B1.7:** medición de °brix.**Figura B1.8:** medición de T°

**Anexo B2: Preparación de la oca amarilla (*Oxalis tuberosas*)**

**Figura B2.1:** recepción de la oca proveniente del centro poblado San José - La Encañada.



**Figura B2. 2:** soleado de las ocas por 14 días.



**Figura B2. 3:** cocción y peso de la oca.



**Figura B2.4:** medición del agua embotellada para la disolución.



**Figura B2. 5:** licuado de las ocas incorporando el agua de mesa.



**Figura B2. 6:** filtrado de la oca utilizando gasa de 10 x 10 cm



**Figura B2.7:** análisis de pH



**Figura B2.8:** medición de °brix.



**Figura B2.9:** medición de T°



### Anexo B3: Elaboración del kéfir de agua artesanal

**Figura B3.1:** recolección de los gránulos de kéfir de agua que se obtuvieron de un cultivo casero.



**Figura B3.2:** pesado de los tibicos.



**Figura B3. 3:** lavado y escurrido de los granos.



**Figura B3.4:** agregado de los granos de kéfir a cada recipiente con su respectivo sustrato (chancaca y oca).



**Figura B3. 5:** tapado de los frascos con una tela fina 15 x 15 cm.



**Figura B3. 6:** rotulado de cada frasco.



*Anexo B4: Análisis microbiológico*

**Figura B4.1:** preparación de las disoluciones.



**Figura B4.2:** inoculación de la muestra.



**Figura B4.3:** siembra por extensión.



### Anexo C: Resultados de la medición de °Brix y pH

#### Anexo C1: Medición de grados Brix y pH del Kéfir de agua con sustrato de chancaca

| Tiempo De Fermentación | Repetición (R) | °Brix Inicial | °Brix Final | Tiempo De Fermentación | Repetición (R) | pH Inicial  | pH Final    |
|------------------------|----------------|---------------|-------------|------------------------|----------------|-------------|-------------|
| 24 h                   | R1             | 8             | 8           | 24 h                   | R1             | 4.52        | 3.55        |
|                        | R2             | 8             | 8           |                        | R2             | 4.97        | 4.01        |
|                        | R3             | 8             | 7.8         |                        | R3             | 4.9         | 3.98        |
| <i>Promedio</i>        |                | <b>8</b>      | <b>7.93</b> | <i>Promedio</i>        |                | <b>4.80</b> | <b>3.85</b> |
| 48 h                   | R1             | 8             | 7.8         | 48 h                   | R1             | 4.52        | 3.31        |
|                        | R2             | 8             | 7.2         |                        | R2             | 4.97        | 3.64        |
|                        | R3             | 8             | 7           |                        | R3             | 4.9         | 3.64        |
| <i>Promedio</i>        |                | <b>8</b>      | <b>7.33</b> | <i>Promedio</i>        |                | <b>4.80</b> | <b>3.53</b> |
| 72 h                   | R1             | 8             | 6.8         | 72 h                   | R1             | 4.52        | 3.17        |
|                        | R2             | 8             | 6.8         |                        | R2             | 4.97        | 3.54        |
|                        | R3             | 8             | 6.4         |                        | R3             | 4.9         | 3.47        |
| <i>Promedio</i>        |                | <b>8</b>      | <b>6.67</b> | <i>Promedio</i>        |                | <b>4.80</b> | <b>3.39</b> |

#### Anexo C2: Medición de grados Brix y pH del Kéfir de agua con sustrato de oca amarilla

| Tiempo De Fermentación | Repetición (R) | °Brix Inicial | °Brix Final | Tiempo De Fermentación | Repetición (R) | pH Inicial  | pH Final    |
|------------------------|----------------|---------------|-------------|------------------------|----------------|-------------|-------------|
| 24 h                   | R1             | 8             | 7           | 24 h                   | R1             | 5.26        | 4.05        |
|                        | R2             | 8             | 7.8         |                        | R2             | 5.97        | 4.79        |
|                        | R3             | 8             | 7.8         |                        | R3             | 5.94        | 4.73        |
| <i>Promedio</i>        |                | <b>8</b>      | <b>7.53</b> | <i>Promedio</i>        |                | <b>5.72</b> | <b>4.52</b> |
| 48 h                   | R1             | 8             | 6           | 48 h                   | R1             | 5.26        | 3.61        |
|                        | R2             | 8             | 5.5         |                        | R2             | 5.97        | 3.99        |
|                        | R3             | 8             | 6           |                        | R3             | 5.94        | 3.98        |
| <i>Promedio</i>        |                | <b>8</b>      | <b>5.83</b> | <i>Promedio</i>        |                | <b>5.72</b> | <b>3.86</b> |
| 72 h                   | R1             | 8             | 5.6         | 72 h                   | R1             | 5.26        | 3.57        |
|                        | R2             | 8             | 5.2         |                        | R2             | 5.97        | 3.98        |
|                        | R3             | 8             | 5           |                        | R3             | 5.94        | 3.95        |
| <i>Promedio</i>        |                | <b>8</b>      | <b>5.27</b> | <i>Promedio</i>        |                | <b>5.72</b> | <b>3.83</b> |

**Anexo D: Resultados microbiológicos de bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido-acéticas y levaduras**

(UFC/mL)

| <b>KEFIR A BASE DE CHANCHACA</b> |                                 |                                 |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>1° ensayo</b>                 |                                 |                                 |                                 |
|                                  | <b>24 horas</b>                 | <b>48 horas</b>                 | <b>72 horas</b>                 |
| <b>BACTERIAS ACIDO LACTICAS</b>  | 2.6 x 10 <sup>3</sup><br>UFC/ml | 4.7 x 10 <sup>3</sup><br>UFC/ml | 6.0 x 10 <sup>3</sup><br>UFC/ml |
| <b>LEVADURAS</b>                 | 1.7 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 3.1 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 5.9 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml |
| <b>BACTERIAS ACIDO ACETICAS</b>  | (*)                             | (*)                             | (*)                             |
| <b>2° ensayo</b>                 |                                 |                                 |                                 |
| <b>BACTERIAS ACIDO LACTICAS</b>  | 2.9 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 5.5 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 8.9 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml |
| <b>LEVADURAS</b>                 | 2.3 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 2.9 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 3.2 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml |
| <b>BACTERIAS ACIDO ACETICAS</b>  | (*)                             | 1.5 x 10 <sup>3</sup><br>UFC/ml | 1.0 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml |
| <b>3° ensayo</b>                 |                                 |                                 |                                 |
| <b>BACTERIAS ACIDO LACTICAS</b>  | 5.5 x 10 <sup>3</sup><br>UFC/ml | 8.1 x 10 <sup>3</sup><br>UFC/ml | 9.6 x 10 <sup>3</sup><br>UFC/ml |
| <b>LEVADURAS</b>                 | 1.4 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 2.6 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 3.5 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml |
| <b>BACTERIAS ACIDO ACETICAS</b>  | (*)                             | 2.2 x 10 <sup>3</sup><br>UFC/ml | 3.9 x 10 <sup>3</sup><br>UFC/ml |

| <b>KEFIR A BASE DE OCA</b>      |                                 |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>1° ensayo</b>                |                                 |                                 |                                 |
|                                 | <b>24 horas</b>                 | <b>48 horas</b>                 | <b>72 horas</b>                 |
| <b>BACTERIAS ACIDO LACTICAS</b> | 1.6 x 10 <sup>5</sup><br>UFC/ml | 3.9 x 10 <sup>5</sup><br>UFC/ml | 5.1 x 10 <sup>5</sup><br>UFC/ml |
| <b>LEVADURAS</b>                | 5.7 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 7.0 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 8.8 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml |
| <b>BACTERIAS ACIDO ACETICAS</b> | (*)                             | (*)                             | (*)                             |
| <b>2° ensayo</b>                |                                 |                                 |                                 |
| <b>BACTERIAS ACIDO LACTICAS</b> | 2.0 x 10 <sup>5</sup><br>UFC/ml | 4.1 x 10 <sup>5</sup><br>UFC/ml | 4.9 x 10 <sup>5</sup><br>UFC/ml |
| <b>LEVADURAS</b>                | 2.7 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 3.4 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 5.4 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml |
| <b>BACTERIAS ACIDO ACETICAS</b> | (*)                             | (*)                             | 1.5 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml |
| <b>3° ensayo</b>                |                                 |                                 |                                 |
| <b>BACTERIAS ACIDO LACTICAS</b> | 6.1 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 8.6 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 1.1 x 10 <sup>5</sup><br>UFC/ml |
| <b>LEVADURAS</b>                | 3.2 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 5.4 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 9.3 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml |
| <b>BACTERIAS ACIDO ACETICAS</b> | (*)                             | 1.3 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml | 4.0 x 10 <sup>4</sup><br>UFC/ml |

(\*) **Crecimiento no significativo:** Los valores de crecimiento están por debajo de lo que se considera optimo.