



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

“PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE KÉFIR DE AGUA.”

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

PRESENTA

I. A. Adriana Juárez Ramírez

Matricula: 2233803893

ORCID: 0009-0005-4761-4215

bumanive@gmail.com

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Jorge Soriano Santos

JURADO

Presidenta: Dra. Edith Ponce Alquícira

Secretario: Dr. Gerardo Díaz Godínez

Vocal: Dra. Lilia Sánchez Minutti

Vocal: Dr. Alejandro Téllez Jurado

Iztapalapa, Ciudad de México, 13 de noviembre del 2025

Dedicatorias:

A todas las personas que, con su apoyo —por pequeño que pareciera—, iluminaron mi camino y me ayudaron a seguir adelante.

A mi familia, en especial a mi hermano, por su constante ayuda. A mis padres, quienes, aunque ya no están físicamente, dejaron en mí la huella de su amor y guía, cimientos de quien soy hoy.

A mis gatitos, por ser mi refugio emocional en los momentos más desafiantes.

Agradecimientos:

A la **SECIHTI**, por el invaluable respaldo económico mediante la beca que hizo posible este proyecto con el apoyo No. 4013819

Al **comité del posgrado en Biotecnología**, por su orientación y por brindarme la oportunidad de formarme en este campo.

Al **Dr. Jorge Soriano Santos**, por su asesoría experta, su confianza en mi trabajo y su guía durante la realización de esta investigación, así como a mis **asesores** que dedicaron tiempo y trabajo para la realización de esta.

A mi familia y a mí misma, por el esfuerzo, la perseverancia y la resiliencia que nos llevaron hasta este logro.

“La maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma
Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de
Calidad (PNPC) de CONACyT, con la referencia 001465”

Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca No. 4013819

Resumen

La crisis global de salud asociada al consumo de alimentos ultraprocesados es responsable del 74% de las muertes mundiales por enfermedades no transmisibles. Esto junto al impacto ambiental de la industria alimentaria demanda urgentemente el desarrollo de alternativas alimentarias sostenibles.

En este sentido, las dietas saludables y sostenibles se presentan como estrategias clave para lograr estos objetivos. Es por ello por lo que en este proyecto se propuso la elaboración de kéfir de agua que representa una alternativa fermentada de gran interés y creciente aumento de ventas internacionales por sus propiedades probióticas, además de propiedades nutricionales y biofuncionales únicas para la prevención de enfermedades no transmisibles como la diabetes, hipertensión, entre otras. Sin embargo, a pesar de su potencial como alimento biofuncional, la producción de kéfir de agua a escala industrial aún enfrenta desafíos, como la inestabilidad de los consorcios microbianos, la falta de tecnologías adaptadas para fermentación a gran escala, y el mantenimiento de las propiedades sensoriales en el producto final.

Esta investigación aborda algunos de estos desafíos para la formulación de kéfir de agua, alineándose con los objetivos de las dietas saludables y sostenibles (FAO/OMS, 2021) a través de dos estrategias: reducción hídrica en el proceso fermentativo y valorización de frutas/verduras de tercera categoría.

Primeramente, se desarrolló una bebida que disminuye en 30% el volumen de operación para su fermentación. Esta bebida mantuvo parámetros fisicoquímicos óptimos (pH 3.68-4.6 por 48h). Al realizar la prueba hedónica con aumento del consorcio microbiano, se pudo observar que un incremento de proteína (2.5% vs 0.18% control) obtuvo mejor perfil sensorial. Al realizar el análisis a esta bebida se puede observar un aumento la actividad antioxidante ($74.1\% \pm 4.484$ inhibición DPPH frente a un $54.8\% \pm 2.443$ registrado en el control).

Para el desarrollo de bebidas “plant based” se validó el uso de jugos de frutas/verduras de tercera categoría como sustratos fermentativos. Se obtuvo buena aceptación sensorial ($p < 0.05$) sobre todo en las formulaciones con mango y manzana con fermentaciones de 24 h. Al incrementar el contenido proteico con mejor aceptación sensorial (2.5%) se puede observar un incremento significativo en polifenoles totales (56.62 ± 5.048 meq AG/L en mango vs 8.75 ± 3.946 control), la reducción natural de azúcares durante fermentación (hasta 60%) y mejoramiento del perfil antioxidante (actividad DPPH 10% mayor que la encontrada en el kéfir comercial).

De esta manera se logró incrementar la concentración del consorcio microbiano para la producción de Kéfir de agua rico en proteínas con características sensoriales aceptables y menor huella hídrica. Así mismo se desarrolló una tecnología de elaboración de kéfir de agua “plant based”, rico en proteína, libre de aditivos y azúcares añadidos de menor huella hídrica, a partir de jugo de frutas y verduras de tercera categoría.

Abstract

The global health crisis associated with the consumption of ultra-processed foods is responsible for 74% of global deaths from non-communicable diseases. This, coupled with the environmental impact of the food industry, urgently demands the development of sustainable food alternatives.

In this context, healthy and sustainable diets are key strategies to achieve these goals. This project therefore focused on developing water kefir, a fermented alternative of great interest with growing international sales due to its probiotic properties, as well as unique nutritional and biofunctional properties for the prevention of non-communicable diseases such as diabetes and hypertension. However, despite its potential as a functional food, the industrial-scale production of water kefir still faces challenges, such as the instability of microbial consortia, a lack of technologies adapted for large-scale fermentation, and maintaining the sensory properties of the final product.

This research addresses some of these challenges in water kefir formulation, aligning with the goals of healthy and sustainable diets (FAO/WHO, 2021) through two strategies: water reduction in the fermentation process and the valorization of grade-out fruits and vegetables.

First, a beverage was developed that reduces water consumption volume for its fermentation by 30%. This beverage maintained optimal physicochemical parameters (pH 3.68-4.6 for 48h). Hedonic testing with an increased microbial consortium load showed that a higher protein content (2.5% vs. 0.18% control) achieved a better sensory profile. Analysis of this beverage revealed increased antioxidant activity ($74.1\% \pm 4.484$ DPPH inhibition compared to $54.8\% \pm 2.443$ in the control).

For the development of "plant-based" beverages, the use of grade-out fruit/vegetable juices as fermentation substrates was validated. Good sensory acceptance ($p < 0.05$) was obtained, particularly in mango and apple formulations fermented for 24 h. By increasing the protein content to the level with the best sensory acceptance (2.5%), a significant increase in total polyphenols was observed (56.62 ± 5.048 meq GA/L in mango vs. 8.75 ± 3.946 in the control), along with a natural reduction of sugars during fermentation (up to 60%) and an improved antioxidant profile (DPPH activity 10% higher than that found in commercial kefir).

Thus, it was possible to increase the concentration of the microbial consortium to produce protein-rich water kefir with acceptable sensory characteristics and a lower water footprint. Furthermore, a technology was developed for producing "plant-based" water kefir, rich in protein, free of additives and added sugars, with a lower water footprint, using grade-out fruit and vegetable juices.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Orígenes y relevancia del kéfir de agua	3
2.1.1. Antecedentes históricos y evolución como alimento funcional.	3
2.1.2. Diferencias clave con el kéfir de leche.....	4
2.2. Propiedades del kéfir de agua como alimento funcional.....	6
2.2.1. Consorcio microbiano y su impacto en la salud gastrointestinal.	6
2.2.2. Valor nutricional y biofuncional.....	9
2.2.3. Potencial para reducir enfermedades no transmisibles.	11
2.3. Enfermedades no transmisibles y la crisis de los sistemas alimentarios	13
2.3.1. El peso de las enfermedades no transmisibles (ENT) en México, estadísticas clave	13
2.3.2. Dietas saludables y sostenibles, un paradigma urgente	13
2.3.2.1. <i>Definición FAO/OMS: Patrones que promueven salud y reducen impacto ambiental.</i>	13
2.3.2.2. <i>Brechas actuales</i>	15
2.4. Kéfir de agua en la transición hacia sistemas sostenibles.....	16
2.4.1. Impacto ambiental de su producción	16
2.4.1.1. <i>Huella de carbono vs. bebidas azucaradas/ultraprocesadas.</i>	16
2.4.1.2. <i>Oportunidad: La fermentación acuosa reduce un 30% las emisiones frente al kéfir lácteo.</i>	17
2.4.2. Economía circular y valorización.....	19
2.4.2.1. <i>Uso de frutas/verduras de tercera categoría como sustratos.</i>	20
2.4.2.2. <i>Uso del consorcio microbiano como aporte nutricional.</i>	21
2.5. Innovación tecnológica y desafíos	22
2.5.1. Innovación en procesos sustentables (descarbonización, eficiencia hídrica).	22
2.5.2. Diseño y elaboración de bebidas plant-based: Aceptación sensorial y mercado. 23	
3. ANTECEDENTES.....	25
4. JUSTIFICACIÓN.....	27
5. HIPÓTESIS.....	29
6. OBJETIVOS	29
6.1. Objetivo general	29
6.2. Objetivos específicos	29

7. METODOLOGÍA	30
7.1. Obtención del consorcio microbiano	35
7.1.1. Activación del consorcio microbiano.	35
7.2. ETAPA 1: Desarrollo del kéfir con reducción del volumen de operación	35
7.2.1. Optimización de parámetros.	35
7.2.2. Caracterización de las bebidas de kéfir con disminución del volumen de operación	37
7.2.3. Evaluación sensorial.	38
7.2.4. Adición variable del consorcio.	39
7.2.5. Evaluación sensorial inmediata: Prueba Tukey.	40
7.2.6. Caracterización de la fórmula seleccionada:	41
7.2.6.1. <i>Bromatológico</i> :	41
7.2.6.2. <i>Actividad antioxidante</i> :	43
7.2.6.3. <i>Recuento microbiano</i> :	46
7.2.6.4. <i>Fisicoquímicos</i> :	47
7.3. ETAPA 2: Fermentación en jugos de frutas/verduras	47
7.3.1. Caracterización de los jugos de frutas/verduras	48
7.3.2. Optimización:	49
7.3.3. Evaluación sensorial inmediata: Prueba Tukey.	50
7.3.4. Análisis post-selección (mejor sustrato):	51
7.3.4.1. <i>Fisicoquímicos</i> :	51
7.3.4.2. <i>Recuento microbiano</i> .	51
7.3.5. Adición variable del consorcio (2%, 5%, 10%)	51
7.3.6. Evaluación sensorial inmediata: Prueba Tukey.	52
7.3.7. Caracterización de la fórmula seleccionada:	52
7.3.7.1. <i>Bromatológico</i> :	52
7.3.7.2. <i>Actividad antioxidante</i> :	52
7.3.7.3. <i>Recuento microbiano</i> :	53
7.3.7.4. <i>Fisicoquímicos</i> :	53
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
8.1. Fermentación acuosa (Etapa 1)	54
8.1.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica (Fase 1)	54
8.1.2. Selección de la mejor variante (evaluación sensorial).	58

8.1.3. Bebida proteica optimizada (Fase 2)	61
8.2. Fermentación en jugos de frutas/verduras (Etapa 2).....	65
8.2.1. Caracterización de los jugos de frutas/verduras (Fase 1)	65
8.2.2. Selección de sustrato óptimo (evaluación sensorial)	66
8.2.3. Análisis comparativos post-selección.....	69
8.2.4. Bebida proteica optimizada (Fase 2)	72
8.3. Limitaciones.....	78
8.3.1. Kéfir con Reducción del volumen de operación	799
8.3.2. Kéfires de Frutas/Verduras	79
9. CONCLUSIONES	80
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS.....	89
Anexo I Curva patrón de glucosa para cuantificación de azúcares totales	89
Anexo II Curva patrón para cuantificación de polifenoles totales.....	90
Anexo III Gráfica de contorno para la aceptabilidad del kéfir reducido en agua	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los granos de kéfir.....	3
Figura 2. Actividad metabólica microbiana durante la fermentación del Kéfir de agua (Modificado de Fiorda et al., 2017)	4
Figura 3. A) Estructura del polisacárido de kéfir de leche; B) Estructura del polisacárido de kéfir de agua (Modificado de Guzel-Seydim et al., 2021)	6
Figura 4. Modificaciones de las características tecnológicas de las bebidas por la fermentación utilizando granos de kéfir de agua (Modificado de Buranelo et al., 2022)	10
Figura 5. Efectos del Kéfir de agua sobre la salud (Modificado de Gökırmaklı et al., 2023, Guzel-Seydim et al., 2021)	12
Figura 6. Plato del bien comer (Guías Alimentarias Mexicanas., 2023)	14
Figura 7. Proceso de producción actual del kéfir de agua (Modificado de Açık et al., 2019) ...	19
Figura 8. Bioeconomía circular: 1. Obtención de materias primas, 2. Diseño del proceso industrial, 3. Producción del producto de interés, 4. Distribución del producto, 5. Consumo del producto, 6. Separación de los residuos de manera adecuada, 7. Reciclaje de los residuos (Modificado de Gómez-Ramos, 2023)	21
Figura 9. Proyección de crecimiento anual del mercado de kéfir de agua(DataIntel., 2023).	24
Figura 10. ETAPA 1: Obtención de kéfir reducido en volumen de operación.....	30
Figura 11. ETAPA 2: Obtención de kéfir de jugos de frutas.....	31
Figura 12. Condiciones experimentales del proceso para la obtención del kéfir con reducción del volumen de operación.....	36
Figura 13. Pasos para la elaboración de la bebida de kéfir proteínico.....	40
Figura 14. Concentración de azúcar residual en las bebidas de kéfir con rvo.....	54
Figura 15. Cantidad de ácido láctico total por unidad de bioproceso de las bebidas de kéfir con rvo.....	55
Figura 16. pH de las bebidas de kéfir con rvo.....	56
Figura 17. Efecto de la rvo sobre el porcentaje de proteína en el grano de kéfir.....	57
Figura 18. Superficie de respuesta de la aceptabilidad del kéfir con rvo.....	59
Figura 19. ANOVA del modelo de regresión para la aceptabilidad del kéfir con rvo.....	59

Figura 20. Aceptabilidad del kéfir proteínico 30% rvo, con 48 h de fermentación.....	61
Figura 21. Concentración de sólidos solubles en los jugos de fruta.....	65
Figura 22. Concentración de azúcares reductores en los jugos de fruta.....	66
Figura 23. Aceptabilidad del kéfir de jugo de manzana no proteínico con respecto al tiempo.....	67
Figura 24. Aceptabilidad del kéfir de jugo de mango no proteínico con respecto al tiempo.....	67
Figura 25. Aceptabilidad del kéfir de jugo de zanahoria no proteínico con respecto al tiempo.....	67
Figura 26. Aceptabilidad del kéfir de jugo de naranja no proteínico con respecto al tiempo.....	68
Figura 27. Concentración de azúcar residual en las bebidas de kéfir de jugos de frutas / verduras.....	70
Figura 28. Acidez titulable en las bebidas de kéfir de jugos de frutas / verduras.....	71
Figura 29. pH de las bebidas de kéfir de jugos de frutas / verduras.....	72
Figura 30. Aceptabilidad del kéfir proteínico de jugo de manzana.....	73
Figura 31. Aceptabilidad del kéfir proteínico de jugo de mango.....	73
Figura 32. Aceptabilidad del kéfir proteínico de jugo de zanahoria.....	73
Figura 33. Aceptabilidad del kéfir proteínico de jugo de naranja.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulación de los medios de fermentación con rvo.....	37
Tabla 2. Masa de gránulos de kéfir añadida para alcanzar la concentración proteica objetivo en un volumen de 100 mL de bebida.....	40
Tabla 3. Valores de la concentración de azúcar residual en las bebidas de kéfir con rvo.....	55
Tabla 4. Cuadro comparativo del análisis bromatológico en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.....	62
Tabla 5. Cuadro comparativo de las propiedades fisicoquímicas en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.....	62
Tabla 6. Cuadro comparativo de la actividad microbiana en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.....	63
Tabla 7. Cuadro comparativo de la actividad antioxidante en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.....	63
Tabla 8. Cuadro comparativo del análisis bromatológico en los kéfires de jugos de frutas / verduras, proteínicos de mayor aceptabilidad.....	74
Tabla 9. Cuadro comparativo del análisis fisicoquímico en los kéfires de jugos de frutas / verduras, proteínicos de mayor aceptabilidad.....	75
Tabla 10. Cuadro comparativo del recuento microbiano en los kéfires de jugos de frutas / verduras, proteínicos de mayor aceptabilidad.....	76
Tabla 11. Cuadro comparativo de actividad antioxidante en los kéfires de jugos de frutas / verduras, proteínicos de mayor aceptabilidad.....	77

1. INTRODUCCIÓN

El sistema alimentario global enfrenta una doble crisis que demanda soluciones urgentes. Por un lado, la carga de las Enfermedades No Transmisibles (ENT), como la diabetes y la hipertensión, es abrumadora, siendo responsables del 74% de las muertes a nivel mundial. Por otro lado, la producción de alimentos es un motor principal de la crisis ambiental, contribuyendo significativamente a las emisiones de gases de efecto invernadero, la pérdida de biodiversidad y la escasez de agua.

Este modelo, intensivo en recursos y a menudo impulsado por productos ultraprocesados, vincula directamente la salud planetaria con la salud humana. Con una población proyectada de 10,000 millones para 2050, la transición hacia dietas saludables y sistemas de producción sostenibles se ha vuelto imperativa para garantizar la seguridad alimentaria y la resiliencia de los sistemas de salud. Este concepto de sostenibilidad, entendido como aquel que "asegura que satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones para satisfacer las propias" (ONU, 1987, p. 29, citado en Gómez Rodríguez, 2020), subraya la urgencia de adoptar modelos circulares donde, sin distinción entre sostenible y sustentable, el capital natural sea preservado.

En este escenario, el kéfir de agua emerge como un candidato con un potencial excepcional para alinearse con estos nuevos paradigmas. Esta bebida fermentada es el resultado de una simbiosis microbiana única contenida en unos gránulos compuestos por una matriz de polisacáridos.

Durante la fermentación, esta comunidad de bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido-acéticas y levaduras transforma una solución simple de agua, sacarosa y materia orgánica nitrogenada en un producto final enriquecido. El resultado es una bebida probiótica, con proteínas

completas que contienen los ocho aminoácidos esenciales, a la que se le atribuyen propiedades biofuncionales que pueden jugar un rol preventivo frente a las ENT.

A pesar de su potencial, la producción de kéfir de agua a escala industrial se ve frenada por desafíos significativos, como la inestabilidad de los consorcios microbianos, la falta de tecnologías adaptadas para fermentación a gran escala, y el mantenimiento de las propiedades sensoriales en el producto final. El proceso tradicional, de naturaleza artesanal, carece de la estandarización y optimización necesarias para garantizar una calidad uniforme y una disponibilidad masiva.

Esta falta de escalabilidad limita el acceso a un alimento que, por sus características inherentes, podría ser un aliado tanto para la salud pública como para la sostenibilidad alimentaria. Superar esta barrera es el siguiente paso crucial para integrar plenamente el kéfir de agua en las dietas modernas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Orígenes y relevancia del kéfir de agua

2.1.1. Antecedentes históricos y evolución como alimento funcional.

El kéfir de agua emerge como una bebida fermentada de interés global, destacando por su perfil sensorial único y propiedades funcionales. Con orígenes históricos aún debatidos - vinculados tanto a tradiciones del Cáucaso como a prácticas mesoamericanas - esta bebida efervescente se obtiene mediante la actividad metabólica de consorcios microbianos alojados en los gránulos de kéfir (Fiorda et al., 2017; Laureys y De Vuyst, 2014). Estos cultivos iniciadores, denominados comúnmente tíbicos (Figura 1), presentan una estructura gelatinosa compuesta principalmente por dextranos que sirven de soporte para comunidades complejas de bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias ácido acéticas (Gulitz et al., 2011; Verce et al., 2019).



Figura 1. Estructura de los granos de kéfir.

La relevancia actual de esta matriz fermentada radica en su doble carácter como alimento tradicional y producto funcional potencial. Investigaciones recientes han evidenciado que su consumo podría ejercer efectos moduladores sobre el ecosistema intestinal, además de presentar actividad antioxidante y propiedades antiinflamatorias (Dimidi et al., 2019; Hsieh et al., 2012). Particularmente, estudios *in vitro* han demostrado capacidad inhibitoria sobre proliferación celular anormal, sugiriendo posibles aplicaciones en prevención de patologías complejas

(Alsayadi et al., 2014). Estos atributos se asocian tanto a los microorganismos viables presentes como a los metabolitos generados durante el proceso fermentativo (Figura 2), entre los que destacan diversos compuestos bioactivos (Patel et al., 2022; Azi et al., 2021).



Figura 2. Actividad metabólica microbiana durante la fermentación del Kéfir de agua (Modificado de Fiorda et al., 2017).

No obstante, el aprovechamiento industrial de este sistema biológico enfrenta retos significativos. La variabilidad de los cultivos, sumada a la falta de protocolos estandarizados para la preservación de los gránulos (Laureys et al., 2017), limita su producción a escala. Adicionalmente, se requiere mayor evidencia clínica que valide los efectos saludables observados en modelos experimentales.

2.1.2. Diferencias clave con el kéfir de leche.

El kéfir de agua y el kéfir de leche comparten su naturaleza de bebidas fermentadas mediante consorcios microbianos simbióticos, sin embargo, presentan diferencias fundamentales en su composición microbiana, requerimientos de sustrato y perfil nutricional, particularmente relevantes para aplicaciones en dietas plant based (Fiorda et al., 2017). Mientras el kéfir de leche depende estrictamente de

sustratos lácteos para mantener la viabilidad de sus granos (dominados por especies como *Lactobacillus kefiranofaciens*), el kéfir de agua prospera en matrices vegetales, lo que lo convierte en una alternativa funcional para consumidores veganos, intolerantes a la lactosa o alérgicos a proteínas lácteas (Moretti et al., 2022).

El kéfir de agua utiliza soluciones azucaradas (sacarosa, melazas) enriquecidas con frutas deshidratadas, que proveen los nutrientes necesarios para el crecimiento de su consorcio microbiano (Laureys & De Vuyst, 2014). A diferencia del kéfir de leche, cuyos gránulos requieren lactosa para sintetizar kefirán (un heteropolisacárido), los gránulos de kéfir de agua producen dextrano (α -1,6-glucano) a partir de sacarosa mediante la acción de *Lentilactobacillus hilgardii* (Waldherr et al., 2010).

Esta diferencia fundamental en el sustrato y en la maquinaria enzimática de sus consorcios microbianos resulta en la síntesis de polisacáridos estructurales con arquitecturas moleculares distintas. La Figura 3 ilustra de manera comparativa la estructura del kefirán (kéfir de leche) y del dextrano (kéfir de agua), tomado de Guzel-Seydim et al. (2021).

La producción de uno u otro polisacárido es una prueba de la especialización de cada consorcio. Esta adaptabilidad a fuentes de carbono específicas es lo que permite al kéfir de agua proliferar en una amplia gama de matrices vegetales, desde infusiones hasta jugos de frutas (Bueno et al., 2021). Por el contrario, la dependencia del consorcio lácteo de la lactosa para sintetizar kefirán explica por qué los gránulos de kéfir de leche no son viables en medios vegetales a largo plazo: experimentos demostraron que bacterias clave del kéfir de agua como *L. hilgardii* no metabolizan lactosa, limitando el crecimiento de los gránulos de kéfir de leche en sustratos no lácteos (Hsieh et al., 2012).

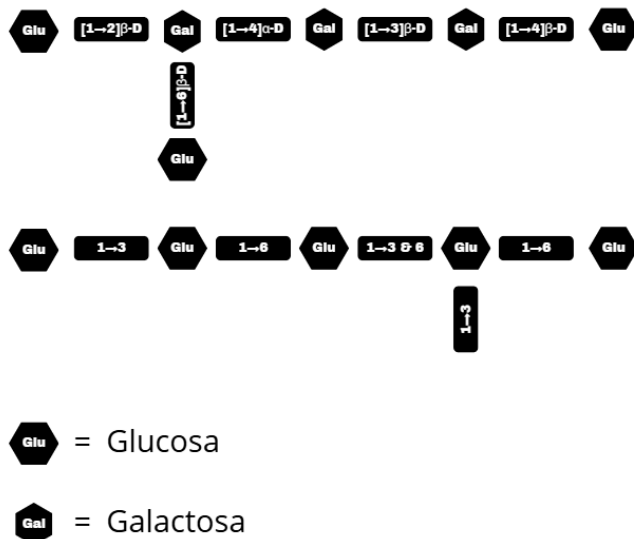


Figura 3. A) Estructura del polisacárido de kéfir de leche; B) Estructura del polisacárido de kéfir de agua (Modificado de Guzel-Seydim et al., 2021).

El kéfir de agua ofrece beneficios clave para aplicaciones en alimentación plant based ya que es libre de alérgenos lácteos (Fiorda et al., 2017); además la versatilidad de sustratos ya que puede fermentar jugos, bebidas vegetales (ej. coco, arroz) y aguas infusionadas (Magalhães et al., 2018).

Requiere menos recursos hídricos y energéticos que la producción láctea (Lynch et al., 2021), adaptándose a los sistemas sostenibles.

Es por esto por lo que el kéfir de agua emerge como una alternativa al kéfir de leche, especialmente relevante en el contexto de dietas basadas en plantas. Su capacidad para fermentar sustratos diversos sin comprometer la viabilidad del consorcio microbiano lo posiciona como un modelo prometedor para el desarrollo de alimentos fermentados sostenibles e inclusivos.

2.2. Propiedades del kéfir de agua como alimento funcional

2.2.1. Consorcio microbiano y su impacto en la salud gastrointestinal.

El kéfir de agua ha emergido como un modelo de fermentación natural, donde comunidades microbianas complejas interactúan simbióticamente para transformar una solución de azúcar en una bebida probiótica refrescante (Laureys & De Vuyst, 2014). A diferencia de su contraparte láctea, este sistema microbiano se puede desarrollar en matrices vegetales, mostrando una notable adaptabilidad a diversos sustratos mientras mantiene una estructura de grano característica compuesta principalmente por dextranos (Gulitz et al., 2011).

El kéfir de agua presenta una comunidad microbiana compleja y altamente especializada, compuesta principalmente por bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias acéticas (BAA) y levaduras. Estudios recientes mediante técnicas de secuenciación masiva han identificado a *L. hilgardii* como la especie bacteriana dominante, responsable de la producción de la matriz de dextrano que caracteriza a los gránulos de kéfir de agua (Laureys & De Vuyst, 2014). Junto con otras BAL como *Lacticaseibacillus paracasei* y *Lentilactobacillus nagelii*, estas bacterias exhiben una notable capacidad para fermentar diversos sustratos azucarados, produciendo metabolitos clave como ácido láctico, etanol y compuestos aromáticos (Gulitz et al., 2011).

Por otra parte, las bacterias acéticas (BAA) y levaduras cumplen roles metabólicos esenciales en el consorcio. Estudios como el de Martínez-Torres et al. (2017) han identificado que *Acetobacter tropicalis* y *Acetobacter okinawensis* son responsables clave de la fermentación acética, oxidando el etanol para producir ácido acético, especialmente en etapas avanzadas de la fermentación. Entre las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* destaca como la principal productora de etanol, mientras que otras, como *Candida californica* y *Pichia membranifaciens*, contribuyen al perfil aromático, aunque con menor capacidad fermentativa. Esta diversidad microbiana sinérgica es la que finalmente define las características únicas de la bebida.

La interacción entre los componentes microbianos del kéfir de agua y el sistema gastrointestinal humano ha sido objeto de creciente interés científico. Investigaciones *in vitro* han demostrado que las cepas de BAL aisladas de kéfir de agua poseen capacidad de adhesión a células epiteliales intestinales y pueden modular positivamente la composición de la microbiota intestinal (Verge et al., 2019). Particularmente, se ha observado que estos microorganismos compiten eficientemente con patógenos intestinales por sitios de adhesión y nutrientes, mientras producen sustancias antimicrobianas como bacteriocinas y ácidos orgánicos (Patel et al., 2022).

Los estudios en modelos animales han proporcionado evidencia adicional sobre los efectos gastrointestinales del kéfir de agua. En ratones, el consumo regular de esta bebida fermentada indujo cambios significativos en la microbiota intestinal, caracterizados por un aumento en la abundancia de *Bacteroidetes* y una reducción en la proporción de *Firmicutes* (Alsayadi et al., 2013). Estos cambios se asociaron con una mejora en los marcadores de integridad de la barrera intestinal, incluyendo mayores niveles de proteínas de unión estrecha como ocludina y zonulina-1 (Brasil et al., 2019).

Los mecanismos propuestos para explicar estos beneficios incluyen la capacidad de las BAL del kéfir de agua para modular la respuesta inmune de la mucosa intestinal. Experimentos con cultivos celulares han mostrado que estas bacterias pueden reducir la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-8, mientras estimulan la secreción de IL-10, una citoquina con propiedades antiinflamatorias (Hsieh et al., 2012). Además, se ha sugerido que los exopolisacáridos producidos por las bacterias del kéfir de agua podrían actuar como prebióticos, estimulando selectivamente el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas (Rocha-Gomes et al., 2018).

Aunque los resultados disponibles son prometedores, es importante destacar que la mayoría de los estudios se han realizado *in vitro* o en

modelos animales. Se requieren más investigaciones clínicas en humanos para establecer dosis efectivas, mecanismos precisos de acción y posibles aplicaciones terapéuticas del kéfir de agua en el manejo de desórdenes gastrointestinales.

La producción de kéfir de agua enfrenta desafíos únicos. La variabilidad en la composición microbiana, influenciada por factores como el origen geográfico de los granos (Lynch et al., 2021), el tipo de sustrato (Magalhães et al., 2018) y las condiciones ambientales (Gökırmaklı et al., 2023), requiere un entendimiento profundo de las relaciones ecológicas dentro del consorcio. Particularmente, el uso de frutas deshidratadas como fuente de nutrientes y el manejo de parámetros como pH y oxígeno disuelto han demostrado ser críticos para mantener la estabilidad del sistema (Laureys et al., 2016).

Avances recientes en técnicas multi-ómicas están permitiendo desentrañar la complejidad de este ecosistema fermentativo. La integración de metagenómica con metabolómica ha revelado, por ejemplo, cómo cepas específicas como *P. membranifaciens* contribuyen al perfil de compuestos bioactivos (Azi et al., 2021). Estos hallazgos abren posibilidades para el diseño racional de procesos fermentativos más eficientes y sostenibles.

2.2.2. Valor nutricional y biofuncional.

El kéfir de agua es una bebida fermentada cuyo valor funcional y sus características organolépticas son el resultado directo de las transformaciones bioquímicas llevadas a cabo por el consorcio microbiano. Como se esquematiza en la Figura 4, durante la fermentación, enzimas microbianas como la invertasa hidrolizan la sacarosa del medio, aumentando el contenido de azúcares reductores (glucosa y fructosa). Estos azúcares son luego metabolizados vía glicólisis y otras rutas, generando los metabolitos característicos como ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono. Estos

compuestos, junto con otros aromáticos volátiles, son los responsables últimos de las propiedades sensoriales y biofuncionales de la bebida.

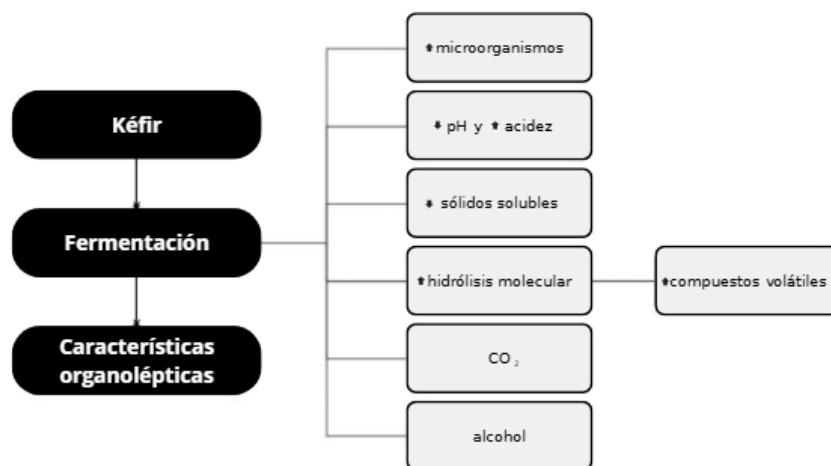


Figura 4. Modificaciones de las características tecnológicas de las bebidas por la fermentación utilizando granos de kéfir de agua (Modificado de Buranelo et al., 2022).

Los microorganismos presentes en el kéfir de agua sintetizan exopolisacáridos (EPS), como dextranos y fructanos, que actúan como prebióticos y moduladores de la microbiota intestinal (Torino et al., 2015). Estos EPS, junto con péptidos bioactivos, flavonoides y ácidos fenólicos generados durante la fermentación, exhiben actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Rodrigues et al., 2016; Alsayadi et al., 2014).

Su composición nutricional y biofuncional incluye:

Compuestos Bioactivos

- Exopolisacáridos (EPS):

Dextranos y fructanos producidos por bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) actúan como prebióticos, mejorando la microbiota intestinal (Torino et al., 2015). *Zymomonas mobilis* sintetiza leván, un polisacárido con propiedades antiinflamatorias y aplicaciones cosmeceúticas (Silbir et al., 2014).

- Ácidos orgánicos (láctico, acético):

Contribuyen al perfil sensorial y exhiben actividad antimicrobiana contra patógenos alimentarios (*Salmonella*, *E. coli*) (Martínez-Torres et al., 2017).

- Compuestos fenólicos y flavonoides:

Producidos por levaduras como *Dekkera bruxellensis* durante la fermentación, aumentan la capacidad antioxidante (Corona., 2016). *Saccharomyces cerevisiae* biosintetiza selenoproteínas y β -glucanos con efectos inmunomoduladores (Eppinga et al., 2014).

Vitaminas y enzimas:

Enriquecimiento natural con vitaminas del grupo B y enzimas digestivas (ej. proteasas).

Propiedades Funcionales

- Actividad probiótica:

Cepas como *Bifidobacterium crudilactis* promueven un efecto bifidogénico en la microbiota infantil (Bondue et al., 2020). *Lactobacillus* spp. aislados del kéfir toleran pH gástrico y sales biliares, adherencia a epitelio intestinal (Talib et al., 2019).

- Efectos bioactivos en alimentos fermentados:

Fermentación de sustratos no lácteos (jugos de frutas, soja) incrementa antioxidantes (ej. fenoles totales) y actividad antimicrobiana.

2.2.3. Potencial para reducir enfermedades no transmisibles.

Las ENT (diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer) están asociadas a estrés oxidativo e inflamación crónica. El kéfir de agua y sus metabolitos ofrecen efectos preventivos y coadyuvantes (Figura 5):

Mecanismos de Acción

- Antioxidante: Neutraliza radicales libres (DPPH, ABTS) y aumenta enzimas endógenas (SOD, CAT) en modelos in vivo. Protege contra

daño hepático (reducción de ALT/AST) y neuroprotección ($\uparrow$ SOD en neuronas).

- Antiinflamatorio: Inhibe vías proinflamatorias (NF- κ B, TLR4/MyD88) y reduce citoquinas (TNF- α , IL-6) en colitis y sepsis. Polisacáridos como kefirán disminuyen edema e inflamación cutánea.
- Antidiabético: Reduce glucemia (71%) y mejora sensibilidad a insulina en ratas diabéticas.
- Cardioprotector: Regula lípidos ($\downarrow$ LDL, $\uparrow$ HDL) y atenúa aterosclerosis.

Aplicaciones a las enfermedades no transmisibles

- Cáncer: Efectos antimetastásicos y antiangiogénicos en células 4T1 ($\uparrow$ apoptosis, modulación de linfocitos T).
- Salud intestinal: Restaura barrera epitelial y aumenta *Bifidobacterias* en modelos de colitis. Alivia síndrome de intestino irritable ($\downarrow$ TNF- α , NF- κ B).
- Neurodegeneración: En modelos de Alzheimer (*A. fabarum*) y neuroblastoma, reduce estrés oxidativo y apoptosis neuronal.

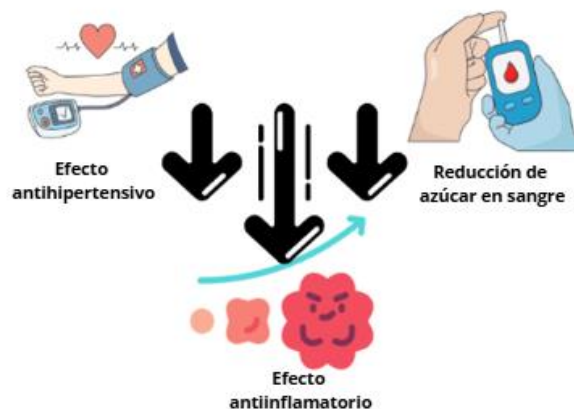


Figura 5. Efectos del Kéfir de agua sobre la salud (Modificado de Gökırmaklı et al., 2023, Guzel-Seydim et al., 2021).

2.3. Enfermedades no transmisibles y la crisis de los sistemas alimentarios

2.3.1. El peso de las enfermedades no transmisibles (ENT) en México, estadísticas clave

Las ENT representan el 74% de las muertes globales (OMS) y 77% en México (ENSANUT 2021). Datos clave:

- Diabetes: 14% de adultos mexicanos afectados, con 104 muertes/100,000 hab. (INEGI, 2022).
- Obesidad: 75% de la población (sobrepeso + obesidad), vinculada al consumo de ultraprocesados (40% de la dieta) (FAO, 2023).
- Costos sanitarios: 1.3% del PIB en atención médica y pérdida de productividad (INSP, 2020).

Factores críticos:

- Transición alimentaria: Reducción del 30% en consumo de leguminosas y granos enteros desde 1990 (FAO).
- Desigualdad en acceso a salud: México destina solo 0.1% del PIB a salud pública (OCDE, 2019), exacerbando disparidades.

2.3.2. Dietas saludables y sostenibles, un paradigma urgente

2.3.2.1. Definición FAO/OMS: Patrones que promueven salud y reducen impacto ambiental.

Las dietas saludables y sostenibles, según la FAO/OMS, son patrones alimentarios que:

- Promueven salud: Previenen malnutrición (desnutrición, obesidad, ENT) mediante el consumo de alimentos frescos, diversos y mínimamente procesados.

- Reducen impacto ambiental: Minimizan emisiones de GEI, uso de agua y tierra, alineándose con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

El "Plato del Bien Comer" (Figura 6) es una herramienta visual que divide los alimentos en 5 grupos:

- Frutas y verduras (50% del plato): Prioriza productos de temporada y locales.
- Granos y cereales integrales: Tortillas de maíz, avena, arroz integral.
- Leguminosas: Frijoles, lentejas, habas (fuentes económicas de proteína y fibra).
- Alimentos de origen animal: Huevo, pollo, pescado (en menor proporción que vegetales).
- Aceites y grasas saludables: En su forma natural (aguacate, semillas).

Base: Agua simple como bebida principal.



Figura 6. Plato del bien comer (Guías Alimentarias Mexicanas., 2023).

El sustento científico para realizar esta división en el plato del bien comer es que reduce 40% el riesgo de diabetes al priorizar fibra y antioxidantes (ENSANUT, 2021). De forma alterna disminuye 20% la huella hídrica comparado con dietas altas en carne (FAO, 2020).

Las guías alimentarias dirigidas a la población mexicana permiten definir cómo debe ser una alimentación saludable, para que las personas puedan seguir buenas prácticas de alimentación de acuerdo con sus costumbres, su cultura, sus recursos socioeconómicos y su ambiente.

2.3.2.2. Brechas actuales

Si bien las definiciones y guías establecen un camino claro hacia la sostenibilidad, la realidad en México presenta brechas profundas que dificultan su implementación. Estas discrepancias se manifiestan en tres problemas principales interconectados: el acceso desigual a alimentos nutritivos con bajo impacto ambiental, el consumo insuficiente de frutas y verduras además de la predominancia de una cultura basada en alimentos ultraprocesados.

En primer lugar, existe una tensión evidente entre el acceso a alimentos nutritivos y su impacto ambiental. Un ejemplo claro son los productos lácteos, que si bien aportan calcio y proteínas de alta calidad, son responsables de aproximadamente el 20% de las emisiones de gases de efecto invernadero del sector agropecuario (FAO, 2020). Frente a esto, existen alternativas sostenibles como algunas bebidas fermentadas tradicionales (kéfir de agua, pozol), que presentan una huella ecológica significativamente menor. Sin embargo, su consumo es limitado, ya que se ha encontrado que solo el 15% de las comunidades los incluyen en su dieta diaria (INSP, 2022), lo que evidencia un problema de acceso y difusión.

En segundo lugar, se identifica un consumo insuficiente de frutas y verduras en todos los segmentos de la población. En niños, solo 2 de cada 10 consumen verduras de forma regular (Guías Alimentarias

México, 2023), mientras que en adultos, el 50% ingiere menos de 190 g al día, frente a los 400 g recomendados por la OMS. Esta brecha es particularmente paradójica en un país megadiverso como México, que cuenta con más de 5,000 plantas comestibles registradas (maíces nativos, amaranto, chía, quelites, etc.). A pesar de esta riqueza, solo el 30% de esta diversidad se utiliza activamente en la dieta diaria, desperdiciándose o ignorándose el 70% restante, junto con su alto valor nutricional y adaptación al clima local (INSP, 2021; CONABIO, 2020).

Finalmente, la tercera brecha es la hegemonía de los ultraprocesados en la cultura alimentaria mexicana. Estos productos (refrescos, snacks, pan industrializado) dominan casi la mitad (40%) de la dieta del mexicano promedio (ENSANUT, 2021). El caso más emblemático es el del refresco, del cual México es el mayor consumidor mundial con 163 litros per cápita al año (OPS). Esta realidad contrasta drásticamente con los principios de las dietas sostenibles y constituye uno de los principales motores de la obesidad y las ENT.

En conjunto, estas brechas subrayan la necesidad urgente de promover alternativas alimentarias que sean a la vez saludables, accesibles, culturalmente pertinentes y de bajo impacto ambiental. Es en este contexto donde el kéfir de agua emerge como un candidato idóneo, alineándose con los objetivos de sostenibilidad y ofreciendo una respuesta concreta a los problemas aquí expuestos.

2.4. Kéfir de agua en la transición hacia sistemas sostenibles

2.4.1. Impacto ambiental de su producción

2.4.1.1. Huella de carbono vs. bebidas azucaradas/ultraprocesadas.

La producción de alimentos es responsable de aproximadamente el 26% de las emisiones globales de GEI (IPCC, 2019), y las bebidas azucaradas contribuyen significativamente a esta cifra. Los estudios comparativos

revelan una marcada diferencia entre estas bebidas industrializadas y el kéfir de agua. Por un lado, los refrescos y jugos envasados generan entre 1.5 y 2.0 kg de CO₂ equivalente por litro. Esta huella elevada se debe al cultivo de caña de azúcar —asociado a deforestación—, al procesamiento térmico, al transporte y, especialmente, al uso de jarabe de maíz de alta fructosa, cuyo cultivo requiere fertilizantes nitrogenados que emiten óxido nitroso, un gas de efecto invernadero particularmente potente (Searchinger et al., 2018).

Por otro lado, el kéfir de agua emite sustancialmente menos, entre 0.8 y 1.2 kg de CO₂ eq. por litro, según análisis de ciclo de vida (Spiller et al., 2019). Los factores clave que explican su menor impacto son el uso de materias primas locales, como frutas de temporada y azúcar no refinada, que reducen la huella de transporte; la fermentación espontánea que no requiere energía para pasteurización, a diferencia de los lácteos (Laureys & De Vuyst, 2014); y el aprovechamiento de residuos orgánicos, ya que la pulpa de frutas residual puede compostarse (Köhler et al., 2021). Esta ventaja se ve reforzada por hallazgos recientes en bioreactores, que muestran que el kéfir de agua producido con *L. hilgardii* y *S. cerevisiae* reduce un 20% más las emisiones que las bebidas basadas en leche, al evitar la fermentación láctica intensiva (Laureys et al., 2021).

2.4.1.2. Oportunidad: La fermentación acuosa reduce un 30% las emisiones frente al kéfir lácteo.

La ventaja ambiental del kéfir de agua se hace aún más evidente al compararlo directamente con el kéfir lácteo, donde la fermentación acuosa demuestra ventajas ambientales cuantificables.

La más significativa es una reducción del 30% en las emisiones de GEI (Spiller et al., 2019). Este descenso se explica fundamentalmente porque el proceso acuoso elimina la necesidad de ganadería, un sector que por sí solo emite 2.4 kg de CO₂eq por cada kg de leche producido (FAO, 2020). Adicionalmente, se logra una mayor eficiencia energética, ya que

la fermentación del kéfir de agua ocurre a temperatura ambiente (20–25°C), consumiendo un 50% menos de energía que los procesos lácteos que requieren mantener cultivos a 37°C (Laureys, 2021).

La diferencia también es abrumadora en cuanto a la huella hídrica: el kéfir lácteo requiere aproximadamente 1,020 L/kg, incluyendo el agua para el cultivo de forraje, mientras que el kéfir de agua necesita sólo 350 L/kg, al prescindir del riego para pastos (Water Footprint Network, 2021).

Más allá de la eficiencia, el kéfir de agua muestra una gran adaptabilidad para utilizar recursos subutilizados. Estudios con sustratos alternativos, como jugo de zanahoria o fresa, demuestran su potencial para elaborarse con excedentes agrícolas, reduciendo así el desperdicio (Corona et al., 2016). Lynch (2021) destaca que el uso de frutas en la producción de kéfir de agua podría disminuir el desperdicio alimentario en un 15–20%.

No obstante, la transición de una producción artesanal a una escala industrial enfrenta desafíos tecnológicos significativos que frenan su optimización y masificación. A pesar de los avances, la producción a este nivel debe lidiar con la inestabilidad inherente de los consorcios microbianos silvestres durante fermentaciones repetidas, la falta de tecnologías de control y monitoreo perfectamente adaptadas para garantizar la consistencia del producto, y la dificultad para mantener de forma uniforme las propiedades sensoriales deseadas en lotes de gran volumen. La Figura 7 ilustra este proceso industrial actual, el cual, si bien permite una mayor disponibilidad, aún carece de la estandarización robusta necesaria para competir con la homogeneidad de las bebidas ultraprocesadas.

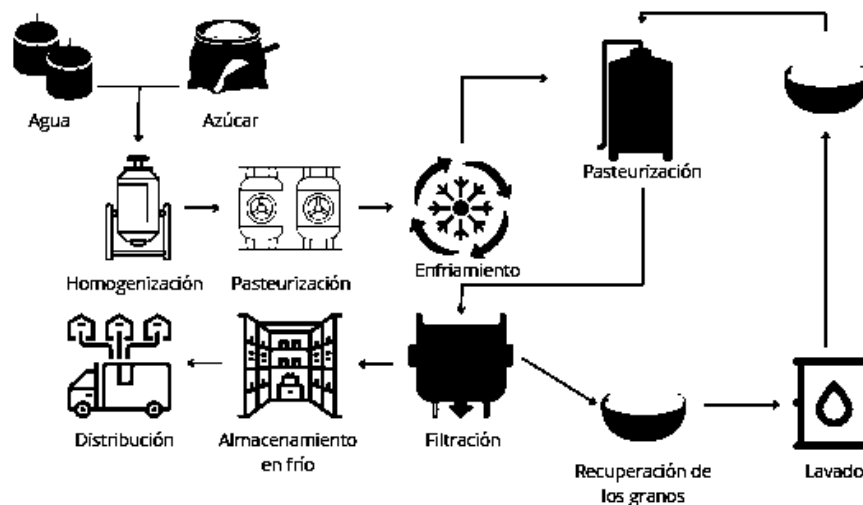


Figura 7. Proceso de producción actual del kéfir de agua (Modificado de Açı́k et al., 2019).

Para superar estos cuellos de botella propios de la escalabilidad, es crucial desarrollar soluciones tecnológicas. Laureys (2021) identificó, por ejemplo, que la congelación de los gránulos daña su estructura y reduce su crecimiento, un problema crítico para su distribución y uso industrial. Como soluciones emergentes, se proponen la liofilización para conservar la viabilidad microbiana sin dañar los polisacáridos (Gulitz, 2013), y el uso de cultivos iniciadores definidos (ej.: *Leuconostoc mesenteroides* + *Hanseniaspora valbyensis*) para mejorar la reproducibilidad y control del proceso (Köhler et al., 2021).

El impacto final trasciende lo ambiental; un kéfir de agua estandarizado y con bajo contenido residual de azúcar (<5 g/100 mL) se posiciona como una alternativa saludable y escalable a los refrescos, alineándose con las directrices de la OMS (Lynch, 2021).

2.4.2. Economía circular y valorización

Cada año en México se producen aproximadamente 23.7 millones de toneladas de desechos provenientes del sector agroalimentario. Este volumen de residuos no solo ocasiona la emisión de cerca de 36 millones de toneladas de CO₂, sino que también representa un desperdicio de alrededor de 40 billones de litros de agua anualmente (SIAP, 2021).

2.4.2.1. Uso de frutas/verduras de tercera categoría como sustratos.

En México, se estima que entre el 20-40% de las frutas y verduras frescas son descartadas anualmente por no cumplir estándares estéticos (tamaño, forma o color), aunque son inocuas para el consumo (SIAP, 2021). El kéfir de agua ofrece una solución sostenible al utilizar estos recursos subvalorados lo cual evitará el desecho de estas, utilizándolos para obtener productos de valor agregado en términos de aplicar la economía circular (Figura 8).

- Valorización de descartes estéticos: Estudios con kéfir de agua fermentado a partir de frutas "imperfectas" (ej.: manzanas, peras o zanahorias no calibradas) muestran que retienen el 85-95% de sus compuestos bioactivos (polifenoles, vitamina C) frente a frutas de "primera categoría" (Corona et al., 2016).
- Beneficios ambientales: Al evitar que estos alimentos terminen en vertederos (donde generan metano), se reduce la huella de carbono en un 15-20% comparado con el uso de frutas estándar (Ordaz-Rodríguez et al., 2022).

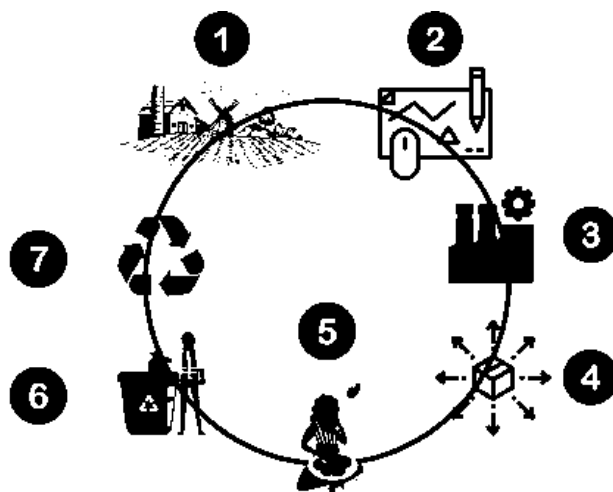


Figura 8. Bioeconomía circular: 1. Obtención de materias primas, 2. Diseño del proceso industrial, 3. Producción del producto de interés, 4. Distribución del producto, 5. Consumo del producto, 6. Separación de los residuos de manera adecuada, 7. Reciclaje de los residuos (Modificado de Gómez-Ramos, 2023).

2.4.2.2. Uso del consorcio microbiano como aporte nutricional.

Los granos de kéfir de agua contienen un consorcio microbiano simbiótico (bacterias ácido lácticas y levaduras) que transforma sustratos simples en productos enriquecidos:

- Biofortificación:
 - Algunas cepas como *L. hilgardii* producen exopolisacáridos (kefirán) con efectos prebióticos (Laureys & De Vuyst, 2014).
 - Levaduras (*S. cerevisiae*) sintetizan vitaminas del grupo B y aminoácidos esenciales (Gamboa-Delgado, 2023).

Por ejemplo, la fermentación de agua de jamaica (hibisco) descartado con kéfir incrementa su actividad antioxidante (30-40% más que el agua fresca), gracias a la acción microbiana (Corona et al., 2016).

Los residuos sólidos post-fermentación (bagazos) pueden reutilizarse como suplemento alimenticio animal por su alto contenido de fibra y proteína microbiana o compostaje para mejorar suelos agrícolas, cerrando el ciclo de nutrientes (Lynch, 2021).

Además, en este trabajo se contempla la adición del consorcio como aporte de proteína unicelular la cual contiene los 8 aminoácidos esenciales, y es de alto valor nutritivo, incorporándose así a la dieta saludable y sostenible.

2.5. Innovación tecnológica y desafíos

La creciente demanda de alimentos sostenibles ha impulsado la innovación tecnológica en la producción de kéfir de agua, centrada en reducir su impacto ambiental y mejorar su aceptación en mercados globales. Sin embargo, persisten desafíos clave que requieren soluciones interdisciplinarias.

2.5.1. Innovación en procesos sustentables (descarbonización, eficiencia hídrica).

Descarbonización:

La producción tradicional de bebidas contribuye significativamente a las emisiones de GEI. Para el kéfir de agua, se han desarrollado estrategias como:

- Fermentación a temperatura ambiente: Elimina la necesidad de energía para calentamiento, reduciendo hasta un 30% las emisiones frente a procesos lácteos (Spiller et al., 2019).
- Uso de energías renovables: Plantas piloto en México integran paneles solares en biorreactores, disminuyendo la huella de carbono en un 25% (INIFAP, 2023).

Eficiencia hídrica:

El kéfir de agua requiere 50% menos agua que las bebidas lácteas (Water Footprint Network, 2022), pero aún puede optimizarse:

- Recirculación de agua en lavado de granos: Sistemas de filtración permiten reutilizar el 80% del agua (Laureys et al., 2021).
- Sustratos hidroeficientes: Jugos de frutas con alta disponibilidad local (ej.: tuna o jamaica) reducen el estrés hídrico asociado a cultivos intensivos (Gómez-Ramos, 2023).

Desafíos:

- Escalabilidad: Laureys et al. (2021) identifican que la transición de procesos artesanales a industriales enfrenta barreras técnicas, como la variabilidad en la actividad metabólica de los gránulos de kéfir en grandes volúmenes, lo que reduce la eficiencia en un 15-20%.
- Costos iniciales: La inversión en biorreactores solares puede ser prohibitiva para pequeños productores (Gamboa-Delgado, 2023).

2.5.2. Diseño y elaboración de bebidas plant-based: Aceptación sensorial y mercado.

Innovación en formulaciones:

- Reducción de azúcares residuales: Fermentaciones controladas con cepas específicas (*L. nagelii*) logran bebidas con <5 g/L de azúcar, cumpliendo estándares de la OMS (Köhler et al., 2021).
- Perfiles sensoriales personalizados: Uso de levaduras no convencionales (*H. valbyensis*) para notas frutales sin *off-flavors* (Laureys & De Vuyst, 2014).

Aceptación del consumidor:

El segmento de bebidas funcionales es uno de los que más interés ha generado en 2024, impulsado por la demanda de productos que mejoren

la salud física y mental. Aunque inicialmente se dirigían a nichos específicos (atletas, adultos mayores), ahora captan un público más amplio gracias a la incorporación de probióticos, adaptógenos y nootrópicos (The Food Tech, 2024). En este contexto, el kéfir de agua destaca por:

- Preferencias regionales: En México, el 68% de los consumidores prefieren sabores locales (tamarindo, guayaba) frente a opciones tradicionales (Nielsen, 2023).
- Crecimiento en mercados premium: En Europa, versiones con <0.5% de alcohol (logrado con cepas modificadas) tienen mayor penetración en el segmento *health-conscious* (Lynch, 2021).
- El mercado global de kéfir de agua representado en la Figura 9, se proyecta con un crecimiento anual del 8.2% hasta 2033, impulsado por la demanda de bebidas probióticas.

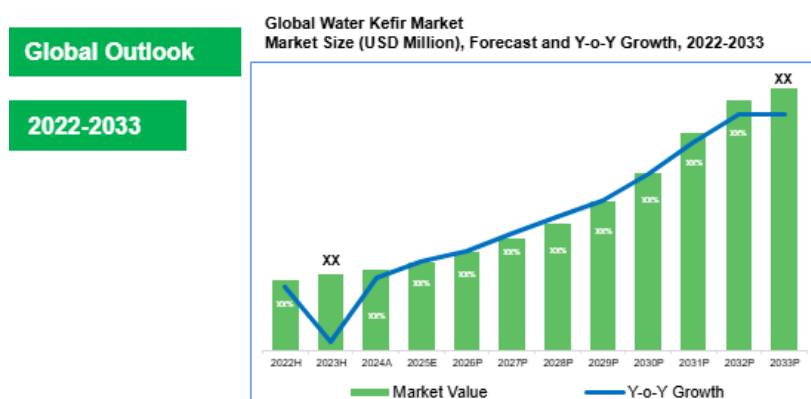


Figura 9. Proyección de crecimiento anual del mercado de kéfir de agua (DataIntel., 2023).

Desafíos:

- Regulación: Inconsistencias en etiquetado de "probióticos" entre países (FDA vs. COFEPRIS).
- Competencia: Bebidas vegetales comerciales (almendra, avena) dominan el 70% del mercado *plant-based* (Mintel, 2023).

3. ANTECEDENTES

En la búsqueda de alternativas saludables en la industria alimentaria, diversos estudios han explorado la incorporación de kéfir en el desarrollo de nuevos productos.

Si bien los estudios de Corona et al. (2016) y Paredes et al. (2022) demuestran el éxito de las bebidas de kéfir de frutas, y el trabajo de Magalhães-Guedes et al. (2020) ilustra el potencial de reutilizar la biomasa de kéfir de leche en paletas, un desafío emergente en la industrialización del kéfir de agua es la gestión del excedente de gránulos. La transición de una producción artesanal a una industrial conlleva inevitablemente un aumento en el volumen de esta biomasa, planteando la necesidad de encontrar aplicaciones sostenibles para ella dentro de un modelo de economía circular.

Como señalan Moretti et al. (2024), '...el hecho de producir kéfir a nivel industrial trae consigo el aumento en el volumen de gránulos (excedente)'. Frente a este desafío, los mismos autores proyectan el desarrollo sostenible de la industria y enumeran diversas aplicaciones potenciales para este excedente subrayando que la biomasa excedente de kéfir de agua no es un desecho, sino un recurso versátil que puede ser gestionado de manera eficiente y sostenible (Moretti et al., 2024)."

También, la fermentación de frutas con kéfir podría aplicarse como estrategia para conservar la fruta como lo comprobaron Hampton y colaboradores en su investigación.

La selección del consorcio microbiano para este estudio se determinó considerando la oferta disponible en el mercado mexicano, donde existen pocas compañías que elaboren y comercialicen kéfir de agua con un consorcio estable y caracterizado. Se optó por los gránulos de la bebida 'Kéfir SIMBIÓTICA-Natural' de la empresa Simbiótica, la cual, si bien es de reciente introducción en el mercado, presenta la ventaja de

ofrecer un etiquetado nutrimental claro, lo que sugiere un proceso de producción estandarizado.

Más allá de su disponibilidad, la elección se vio respaldada por las características reportadas del producto final. El perfil sensorial descrito por el fabricante “de dulzor de medio a bajo, acidez baja y efervescencia ligera” se consideró un indicador de una fermentación equilibrada, ideal para el desarrollo de bebidas con alta aceptabilidad potencial. Asimismo, su atribución de promover el balance de la microbiota intestinal alineaba el consorcio con el objetivo de desarrollar un alimento biofuncional.

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el consumo excesivo de alimentos ultraprocesados está directamente relacionado con las enfermedades no transmisibles (Swinburn et al., 2019) que matan a 41 millones de personas cada año, lo que equivale al 74% de todas las muertes en el mundo (OMS., 2023).

Además, la cadena de valor de la industria alimentaria es responsable de la emisión de un tercio de los gases de efecto invernadero producidos y de la pérdida de la biodiversidad, generando escasez de agua (Searchinger et al., 2018).

Por otro lado, la disminución en la cantidad o calidad de los alimentos como resultado de las decisiones y acciones de los minoristas, proveedores de servicios alimentarios y consumidores, genera desperdicio de alimentos, aproximadamente el 37%, de acuerdo con el Banco de Alimentos de México (PROFECO., 2022).

Se pretende que para el año 2050 se cuente con recursos alimentarios suficientes, y un sistema de salud basado en la prevención, ya que para esta fecha se prevé un aumento de la población a diez mil millones de personas, que al seguir con el consumo de alimentos ultraprocesados y por tanto aumentar las ENT rebasarían los sistemas de salud por un lado y, por otro, que al existir pérdida de recursos naturales actuales no existiría suficiencia en el futuro para alimentar a la población.

Por lo tanto, para garantizar la seguridad alimentaria y la salud de la población en las próximas décadas, es crucial abordar estos desafíos mediante la transformación de los sistemas alimentarios (Willett et al., 2019). Es por eso por lo que ha habido tendencias por optar hacia dietas saludables y sostenibles las cuales han sido definidas por la FAO y la OMS como patrones alimenticios que promueven todas las dimensiones de la salud y bienestar de los individuos además de tener un impacto bajo en el medio ambiente (FAO, 2021).

La adopción de dietas basadas en alimentos de origen vegetal y la reducción del consumo de carne se presentan como estrategias clave para lograr estos objetivos. Se conoce que la producción y consumo de vegetales y frutas generan una baja huella de carbono y podrían disminuir la huella hídrica, especialmente empleando tecnologías agrícolas de cultivo adecuadas. Asimismo, la disminución de la producción de carne de crianza y la opción por la producción de carne artificial y alimentos “plant-based” se presentan como alternativas prometedoras.

En este contexto, la formulación de productos “plant-based”, y en el caso particular los elaborados a base de kéfir que se creen a base de procesos alimentarios sostenibles ofrece beneficios ambientales que participen en la descarbonización de los sistemas alimentarios. La elaboración de bebidas a base de kéfir reduciendo el volumen de operación para el proceso, así como bebidas a base de kéfir, frutales o vegetales, preparadas con materia prima de tercera categoría sin emplear agua con sacarosa para su fermentación se presenta como una alternativa prometedora para impulsar la transición de este sistema milenario hacia dietas más saludables y sostenibles, disminuyendo con ello la huella de carbono y la huella hídrica asociadas a la producción de alimentos.

El desarrollo de estos productos también puede aportar propiedades biofuncionales, gracias a la presencia de microorganismos probióticos y compuestos bioactivos derivados del proceso de fermentación. Estos atributos pueden contribuir a la promoción de la salud y el bienestar de los consumidores, en línea con los objetivos de las dietas saludables y sostenibles.

5. HIPÓTESIS

Es posible obtener un producto de kéfir de agua rico en proteínas, a través de un proceso sustentable, con características sensoriales aceptables, aplicando las reglas generales de descarbonización y reducción de la huella hídrica del proceso.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Proponer una tecnología sustentable para la elaboración de kéfir de agua “plant based” que pueda ser incorporado en la dieta saludable y sostenible.

6.2. Objetivos específicos

- Optimizar la concentración del consorcio microbiano para la producción de Kéfir de agua rico en proteínas con características sensoriales aceptables y menor huella hídrica.
- Proponer una tecnología de elaboración de kéfir de agua “plant based”, rico en proteína, libre de aditivos y azúcares añadidos de menor huella hídrica, a partir de jugo de frutas y verduras de tercera categoría.

7. METODOLOGÍA

Para la metodología de este proyecto se realizó un plan de trabajo que comprendió de las siguientes etapas:

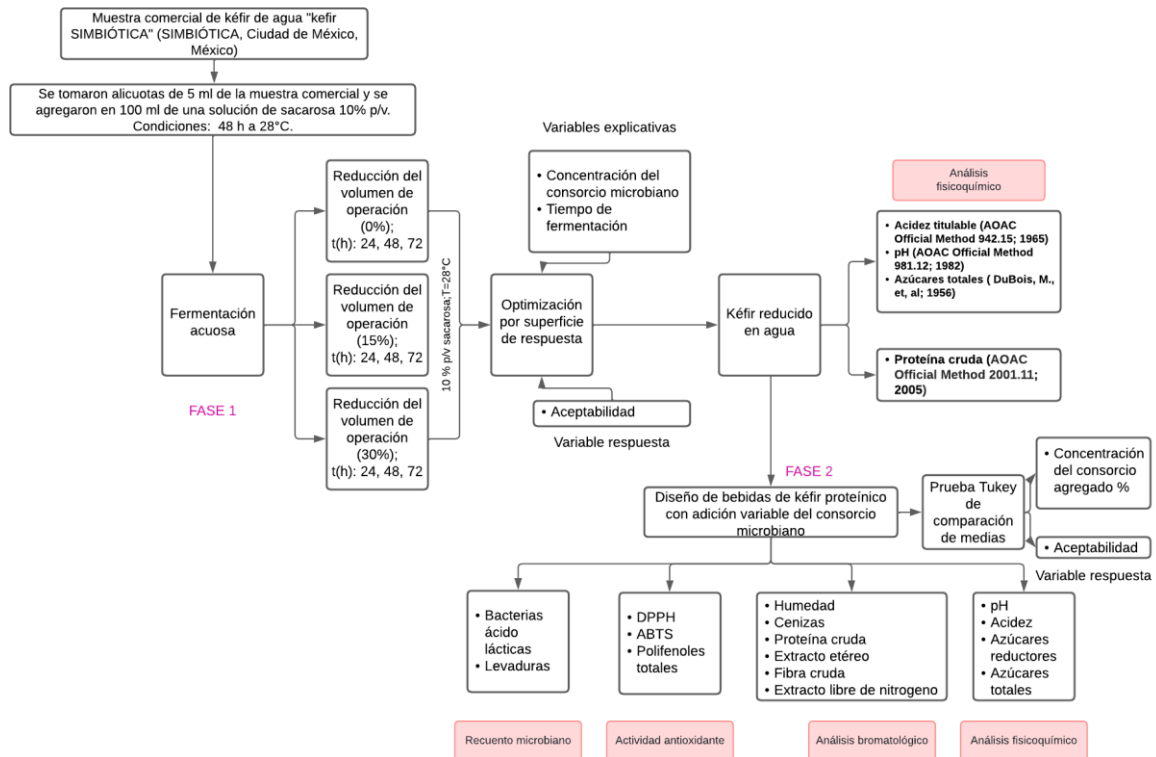


Figura 10. ETAPA 1: Obtención de kéfir reducido en volumen de operación.

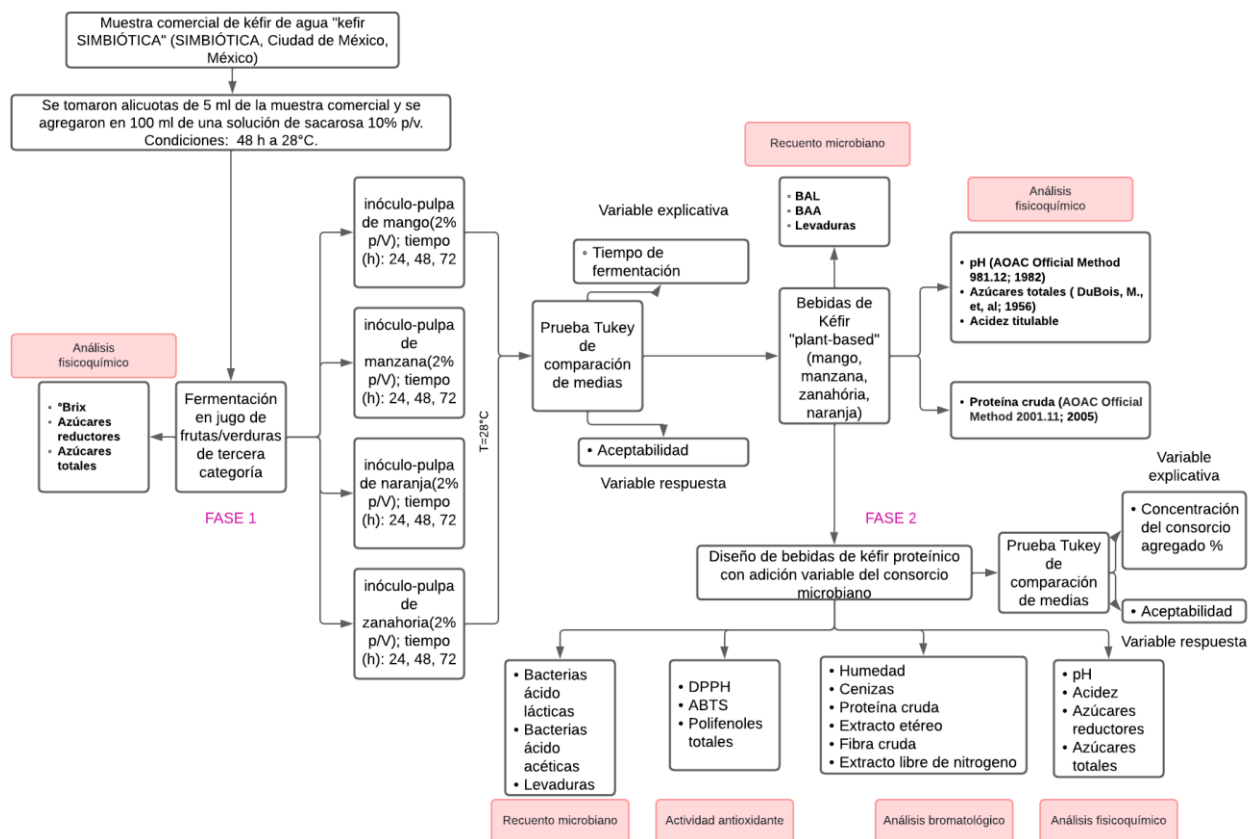


Figura 11. ETAPA 2: Obtención de kéfir de jugos de frutas.

Para la realización de este proyecto de investigación se utilizaron los siguientes materiales, reactivos y equipos:

Materiales:

- Kéfir de agua "SIMBIOTICA": Adquirido en línea (SIMBIOTICA, Ciudad de México, México).
- Azúcar mascabado genuino METCO: Comercializado por Walmart y transportado hasta la planta piloto para su uso.
- Frutas y hortalizas frescas de tercera categoría (manzana, mango, zanahoria y naranja): Obtenidas en la Central de Abastos y trasladadas en bolsas hasta la planta piloto.

Reactivos:

Determinación de pH

- Solución tampón de calibración (pH 4.0, 7.0 y/o 10.0).
- Agua destilada o desionizada.

Acidez titulable

- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N.
- Fenolftaleína al 1% (indicador).
- Agua destilada.

Azúcares totales (Método Dubois)

- Fenol acuoso al 5%.
- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , 98%).
- Glucosa patrón (para curva de calibración).

Azúcares reductores (Método DNS)

- Reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

- Tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle).
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Glucosa patrón (para curva de calibración).

Grados Brix (Refractometría)

- Agua destilada (para calibración del refractómetro).

Proteínas (Método Kjeldahl)

- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).
- Catalizador (mezcla de sulfato de potasio y sulfato de cobre, $\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
- Hidróxido de sodio (NaOH) 40%.
- Ácido bórico (H_3BO_3) al 2%.
- Indicador de mezcla (rojo de metilo + azul de metileno).
- Ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N (para titulación).

Polifenoles totales (Método Folin-Ciocalteu)

- Reactivo Folin-Ciocalteu.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20%.
- Ácido gálico o catequina (patrón para curva de calibración).

Actividad antioxidante (DPPH y ABTS)

- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo en etanol/metanol.
- ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) en buffer fosfato.
- Trolox o ácido ascórbico (patrón para curva de calibración).

Fibra cruda (Método químico-gravimétrico)

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.255 N.
- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.313 N.
- Acetona (para lavado).

Recuento microbiano

- Agua peptonada (Millipore).
- Agar Levadura Glucosa Cloranfenicol (Millipore).
- Agar Man, Rogosa y Sharpe (Millipore).

Equipos:

Para determinaciones fisicoquímicas y bromatológicas:

1. Potenciómetro (con electrodo de calibración).
2. Balanza analítica (precisión ± 0.0001 g).
3. Refractómetro (para °Brix).
4. Espectrofotómetro UV-Vis (marca Thermo Spectronic, modelo Genesys 10).
5. Baño María (para reacciones controladas).
6. Centrífuga (marca Rotina, modelo 420).
7. Licuadora (marca Oster, modelo Best-02-E01).
8. Extractor de jugos (marca Oster®, modelo FPSTJE316P).

Para determinaciones bromatológicas (humedad, cenizas, extracto etéreo):

9. Estufa (para secado a 105°C , determinación de humedad).
10. Mufla (para incineración a 550°C , determinación de cenizas).
11. Soxhlet (para extracción de lípidos con éter de petróleo).

Para recuento microbiano

- Caja Petri 90 X 15 mm (marca Interlux, Klinicus).
- Asa de siembra en L (modelo CRM-5010PH).
- Contador de colonias bacterianas microbianas (marca YUCHENGTECH)

7.1. Obtención del consorcio microbiano

7.1.1. Activación del consorcio microbiano.

Se realizó la activación de los gránulos de kéfir tomando alícuotas de 5 mL del inóculo comercial y agregándolas a 100 mL de una solución de sacarosa al 10% p/v. La activación se llevó a cabo en frascos de vidrio de 250 mL (capacidad útil de 100 mL), los cuales se cubrieron con una doble capa de gasa estéril asegurada con una banda elástica para permitir el intercambio gaseoso (evitar la acumulación de CO₂) y prevenir la contaminación. Los frascos se mantuvieron en condiciones de oscuridad dentro de una estufa de incubación a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Tras este período, los gránulos se recuperaron por filtración para su uso posterior.

7.2. ETAPA 1: Desarrollo del kéfir con reducción del volumen de operación.

Fase 1: Fermentación acuosa

7.2.1. Optimización de parámetros.

Se evaluó el efecto de dos factores clave en la fermentación: el tiempo de fermentación (24, 48 y 72 h) y el porcentaje de reducción del volumen de operación en el medio (0%, 15% y 30%). Esto se implementó mediante un diseño factorial completo 3x3. Este diseño permite investigar de manera sistemática las 9 condiciones experimentales, como se observa

en la figura 12, resultantes de la combinación de todos los niveles de ambos factores, con el fin de identificar su influencia individual y su posible interacción en las características fisicoquímicas y microbiológicas del kéfir final.

Para cada una de las 9 condiciones experimentales definidas por el diseño, se utilizaron 2 gramos del consorcio microbiano húmedo y activado (recuperado según el punto 7.1.1 y tamizado para eliminar el exceso de líquido).

Los medios de fermentación se prepararon añadiendo a frascos de vidrio de 250 mL las siguientes cantidades de agua potable: 100 mL (0% reducción), 85 mL (15% reducción) y 70 mL (30% reducción). A cada frasco se le adicionó sacarosa (azúcar mascabado) en una concentración del 10% p/v.

El inóculo (2g) se añadió a cada frasco, se agitó suavemente para homogeneizar. Los frascos se taparon con gasa estéril y se aseguraron con una banda elástica y se colocaron en una estufa de incubación a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, en ausencia de luz, para su fermentación. Las muestras se retiraron y analizaron a los tiempos establecidos (24, 48 y 72 h).

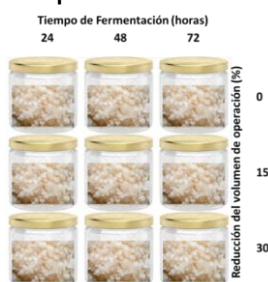


Figura 12. Condiciones experimentales del proceso para la obtención del kéfir con reducción del volumen de operación.

Para cuantificar la reducción del volumen de operación (rvo), se estableció una formulación considerando el volumen total del medio.

Partiendo de un volumen de referencia de 100 mL para el tratamiento control (0% reducción), los volúmenes de agua se ajustaron como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Formulación de los medios de fermentación con rvo.

% de RVO	Volumen de Agua (mL)	Masa de Sacarosa (g)	Concentración de Sacarosa (% p/v)	Masa de Inóculo (g)	Concentración Real de Inóculo (% p/v)
0% (Control)	100.0	10.00	10.0	2.00	2.00
15%	85.0	8.50	10.0	2.00	2.35
30%	70.0	7.00	10.0	2.00	2.86

7.2.2. Caracterización de las bebidas de kéfir con disminución del volumen de operación.

pH.

Para la determinación de pH se tomaron 15 mL de cada una de las bebidas de kéfir de agua. El pH de cada muestra de kéfir de agua se midió utilizando un potenciómetro previamente calibrado con soluciones tampón (pH 4.0, 7.0 y 10.0).

Cada medición se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad. Se reportó el valor promedio $\pm$ desviación estándar.

Acidez titulable (Método AOAC 942.15)

Se titularon 10 mL de muestra de kéfir con NaOH 0.1 N, utilizando fenolftaleína al 1% como indicador (punto final: color rosa tenue).

La acidez se expresó como porcentaje de ácido láctico (g/100 mL), considerando el volumen de NaOH gastado.

Azúcares totales (Método Dubois)

Se tomó 1 mL de la muestra y se diluyó en 10 mL de agua destilada. Se mezcló 1 mL de muestra diluida con 1 mL de fenol acuoso al 5% y 5 mL de H₂SO₄ concentrado.

Tras 10 min en baño María a 30°C, se midió la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro.

Se usó glucosa patrón (0–100 mg/L) para correlacionar absorbancia-concentración.

7.2.3. Evaluación sensorial.

La aceptación de las 9 bebidas fermentadas (derivadas de las combinaciones de 24, 48 y 72 horas de fermentación y 0%, 15% y 30% de rvo) se evaluó mediante una escala hedónica de 7 puntos.

- Muestra: 75 panelistas no entrenados participaron en la evaluación, realizada a través de formularios digitales (Google Forms).
- Diseño experimental: Los datos se organizaron bajo un diseño factorial 3×3 para analizar el efecto independiente de cada factor (tiempo de fermentación y reducción del volumen de operación) sobre la aceptación sensorial.

Aunque el diseño factorial permite evaluar el efecto individual de cada variable, presenta limitaciones para:

- Identificar interacciones significativas entre factores.
- Describir con precisión el comportamiento no lineal de las respuestas.

Para abordar estas limitaciones, se aplicó el método de superficie de respuesta (MSR) (Moreno et al., 2015), el cual modela matemáticamente la relación entre variables independientes y respuestas mediante un ajuste polinomial (Gutiérrez-Pulido, 2004). El modelo general se expresa como:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{k=1}^k \beta_{kk} x_k^2 + \epsilon$$

Donde:

- Y = Variable respuesta (ej.: puntuación hedónica).
- X_i, X_j = Factores independientes (tiempo, volumen de operación).
- β = Coeficientes del modelo.
- ϵ = Error experimental.

Fase 2. Diseño de bebida proteica

7.2.4. Adición variable del consorcio.

Se utilizó la bebida de kéfir que obtuvo la mayor aceptación sensorial en la etapa anterior (definida por el tiempo de fermentación y porcentaje de rvo óptimos). A partir de esta bebida, se recuperaron y prepararon los gránulos para su incorporación como fuente de proteína, siguiendo el proceso que se esquematiza en la Figura 13.

Recuperación y preparación del grano de kéfir:

- Filtración: La bebida seleccionada se filtró para separar y recuperar los granos de kéfir húmedos.
- Caracterización proteica: Se determinó el porcentaje de proteína cruda en los granos húmedos mediante el método Kjeldahl (AOAC 2001.11)

Los granos húmedos se trituraron homogéneamente con la bebida base en las siguientes proporciones:

- 2.5% (p/v) de proteína.
- 3.5% (p/v) de proteína.
- 5.0% (p/v) de proteína.



Figura 13. Pasos para la elaboración de la bebida de kéfir proteínico.

Las concentraciones se calcularon considerando el contenido proteico previamente cuantificado en los granos (Tabla 2).

Tabla 2. Masa de gránulos de kéfir añadida para alcanzar la concentración proteica objetivo en un volumen de 100 mL de bebida.

Concentración de proteína en las bebidas de kéfir	Masa añadida de grano de kéfir a 100 mL de bebida
2.5%	90.3g
3.5%	126.4g
5.0%	180.5 g

7.2.5. Evaluación sensorial inmediata: Prueba Tukey.

La aceptabilidad de las tres formulaciones de kéfir proteínico (con 2.5%, 3.5% y 5.0% de proteína) se evaluó mediante una escala hedónica de 7 puntos.

Panelistas y metodología:

- Participantes: 70 jueces no entrenados.
- Plataforma: Encuestas digitales estandarizadas (*Google Forms*), diseñadas para evitar sesgos (orden aleatorio de presentación de muestras).

- Variables evaluadas: Aceptabilidad.

Para el análisis estadístico se aplicó una prueba Tukey para identificar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias de aceptabilidad de las tres concentraciones de proteína.

7.2.6. Caracterización de la fórmula seleccionada:

7.2.6.1. Bromatológico:

Humedad (Método de secado en estufa AOAC 930.15, 2000)

Se colocaron 5 g de muestra (bebida de kéfir proteínico previamente homogenizado) en cápsulas de porcelana previamente secadas y taradas.

El secado se realizó en estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta peso constante (24 h).

Para el cálculo se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ Humedad} = ((\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Pesos fresco}) * 100$$

Cenizas (Método de cenizas totales AOAC 945.38 980.25)

El residuo seco (de la determinación de humedad) se calcinó en mufla a $550 \pm 15^\circ\text{C}$ durante 3 h.

Se enfrió en desecador con sílica gel hasta alcanzar temperatura ambiente.

Para el cálculo se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ Cenizas} = (\text{Peso cenizas} / \text{Peso muestra seca}) * 100$$

Proteína (Método Kjeldahl AOAC 2001.11)

La digestión se llevó a cabo tomando 1 g de muestra (bebida de kéfir proteínico previamente homogenizado) con 5 mL H_2SO_4 concentrado y

0.8 g de catalizador de sales de selenio en bloque digestor (400°C, hasta solución verde-clara).

Para la destilación, la neutralización fue llevada a cabo con NaOH 40%, arrastre de NH₃ con vapor a H₃BO₃ 2%.

La etapa de titulación se llevó a cabo con HCl 0.1 N.

Para el cálculo se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{(\text{mL HCl muestra} - \text{mL HCl blanco}) * \text{NHCl} * 1.4007}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

$$\text{Peso de la muestra (g)}$$

$$\% \text{Proteína cruda} = \% \text{Nitrógeno total} * 6.25$$

Extracto etéreo

2 g de muestra seca (libre de humedad) se colocaron en cartuchos de celulosa. Con éter de petróleo se llevó a cabo la destilación (punto de ebullición 40–60°C) durante 4 h (20 ciclos/hora). Durante la evaporación el solvente se recuperó en rotavapor, y el residuo graso se secó a 105°C por 1 h.

Para el cálculo se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{Grasa} = (\text{Peso grasa} / \text{Peso muestra seca}) * 100$$

Fibra cruda

2 g de muestra seca sin desengrasar se homogenizaron y pesaron.

Para la digestión ácida se añadieron 200 mL de H₂SO₄ 0.255 N a un vaso de berzellius con la muestra. Suavemente en digestor de reflujo (con condensador) se hirvió durante 30 min. Filtración en caliente a través de embudo con filtro de vidrio sinterizado. Lavado del residuo con agua caliente hasta neutralizar (pH ~7 con papel indicador).

Para la digestión alcalina se transfirió el residuo al mismo digestor con 200 mL de NaOH 0.313 N y se hirvió 30 min bajo reflujo. Se filtró y lavó nuevamente primeramente con agua caliente (hasta eliminar álcali) y acetona (10 mL, para remover lípidos residuales). En su crisol

previamente secado y tarado se agregó la muestra y se seca en estufa a 105°C hasta peso constante (~4 h). El residuo se incineró en mufla a 550°C por 2 h y se enfrió en desecador y pesó.

Para el cálculo se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{Fibra cruda} = \frac{(\text{Peso fibra seca} - \text{Peso cenizas})}{\text{Peso muestra seca}} * 100$$

Extracto libre de nitrógeno

Para el cálculo del extracto libre de nitrógeno se realizó por diferencia con las otras determinaciones:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100\% - (\% \text{ PC} + \% \text{ GC} + \% \text{ FC} + \% \text{ C})$$

Donde:

- % PC: Porcentaje de Proteína Cruda.
- % GC: Porcentaje de Grasa Cruda.
- % FC: Porcentaje de Fibra Cruda.
- % C: Porcentaje de Cenizas.

7.2.6.2. Actividad antioxidante:

DPPH (Brand-Williams et al., 1995)

Los antioxidantes donan electrones/hidrógeno al radical DPPH• (color púrpura), reduciéndolo a DPPH-H (incoloro). La disminución de absorbancia a 517 nm es proporcional a la actividad antioxidante.

Solución madre de DPPH:

- Disolver 3.94 mg de DPPH en 100 mL de etanol absoluto (concentración: 0.1 mM).
- Almacenar en oscuridad a 4°C (estable por 48 h).

Solución de trabajo:

- Diluir la solución madre con etanol hasta alcanzar absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 517 nm (espectrofotómetro).

Reacción:

- Mezclar 50 μ L de muestra (o estándar de Trolox/ácido ascórbico) con 2.95 mL de solución de DPPH.
- Incubar 30 min en oscuridad a 25°C.
- Medir absorbancia a 517 nm (blanco: etanol + DPPH).

Para calcular el % Inhibición:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{blanco}}} * 100$$

ABTS (Re et al., 1999)

Generación del radical ABTS•:

- Mezclar 7 mM de ABTS (19.2 mg en 5 mL agua) con 2.45 mM de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, 3.3 mg en 5 mL agua).
- Incubar 12–16 h en oscuridad a 25°C hasta obtener color verde-azulado intenso.
- Diluir con etanol o buffer fosfato (pH 7.4) hasta absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm.

Reacción:

- Mezclar 50 μ L de muestra con 3 mL de ABTS•.
- Incubar 6 min en oscuridad a 25°C.
- Medir absorbancia a 734 nm (blanco: buffer/etanol + ABTS•).

Para calcular el % Inhibición:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{blanco}}} * 100$$

Polifenoles totales (Método Folin-Ciocalteu)

Los polifenoles totales se cuantificaron mediante el método de Folin-Ciocalteu, basado en la oxidación de los grupos fenólicos en medio alcalino, generando un complejo azul con un máximo de absorción a 765 nm (Chung et al., 1998). La intensidad de color es proporcional a la concentración de polifenoles y se cuantifica en equivalentes de ácido gálico (EGA).

Para la preparación del reactivo Folin-Ciocalteu se mezclaron:

- 100 g de tungstato de sodio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- 25 g de molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- 100 mL de HCl concentrado (37%).
- 50 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 85%).
- 700 mL de agua destilada.

La mezcla se hirvió a reflujo durante 10 h y se añadieron 150 g de sulfato de litio (Li_2SO_4) para estabilizar el reactivo, obteniendo una solución de color amarillo intenso.

Procedimiento experimental

- Curva patrón:
 - Se preparó una serie de diluciones de ácido gálico (0–500 mg/L).
 - Se mezcló 0.5 mL de cada estándar con 2.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 1:10) y 2 mL de Na_2CO_3 al 20%.
 - Se incubó 30 min en oscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm.
- Preparación de muestras:
 - Se homogenizó 1 mL de muestra de kéfir con 5 mL de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min (centrífuga Rotina 420).

- El sobrenadante se filtró (papel Whatman No. 1) y se diluyó 1:5 con agua destilada.
- Reacción y lectura:
 - Se mezcló 0.5 mL del extracto con 2.5 mL de Folin-Ciocalteu (1:10) y 2 mL de Na₂CO₃ al 20%.
 - Tras 60 min de incubación en oscuridad, se midió la absorbancia a 765 nm.

La concentración de polifenoles se determinó mediante la recta de calibración de ácido gálico (Anexo II) y se expresó como:

$$\text{Polifenoles totales (meq AG/L)} = \frac{C * \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de muestra (mL)}}$$

Donde:

- C = Concentración interpolada de la curva (mg/L).

7.2.6.3. Recuento microbiano:

Preparación de muestras y diluciones

- Homogeneización inicial: Se mezclaron 10 mL de cada bebida de kéfir con 90 mL de agua peptonada al 0.1% estéril (autoclavada a 121°C por 15 min) para obtener la dilución 10⁻¹.
- Diluciones seriadas: A partir de esta, se prepararon diluciones sucesivas (10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴) en agua peptonada estéril, manteniendo condiciones asépticas.

Técnica de siembra

- Método: Siembra por esparcimiento en superficie (*spread plate*):
 1. Se depositó 1 mL de cada dilución en placas Petri estériles.

2. La muestra se distribuyó uniformemente sobre la superficie del agar utilizando un asa de Drigalski estéril (en movimiento en forma de "L").
3. Se dejó absorber la muestra durante 10 min antes de la incubación.

Medios de cultivo e incubación

- Bacterias Ácido Lácticas (BAL):
 - Medio: Agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe), pH 6.2 ± 0.2.
 - Incubación: 72 h a 37°C en condiciones de microaerofilia.
- Levaduras:
 - Medio: Agar YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) para inhibir bacterias.
 - Incubación: 72 h a 28°C en aerobiosis.

Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{UFC / mL} = \frac{\text{Nº de colonias} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen sembrado (mL)}}$$

7.2.6.4. Fisicoquímicos:

La caracterización de pH, acidez titulable, °Brix y azúcares reductores se realizó mediante los mismos métodos descritos en la Sección 6.2.2, empleando:

- Mismas condiciones instrumentales.
- Idénticos reactivos y estándares.
- Procedimientos de triplicado.

7.3. ETAPA 2: Fermentación en jugos de frutas/verduras

Fase 1. Desarrollo de bebidas *plant-based*

Para la elaboración de las bebidas fermentadas, se utilizaron jugos extraídos directamente de frutas y verduras de tercera categoría (manzana, mango, zanahoria y naranja), procesados en un extractor de jugos Oster® (modelo FPSTJE316P). El proceso de extracción se realizó el mismo día de la inoculación para minimizar la degradación natural y la contaminación microbiana inicial.

Los jugos obtenidos se caracterizaron fisicoquímicamente (como se detalla en el apartado 7.3.1) para establecer sus propiedades de partida, las cuales sirvieron como línea base (control) para evaluar el impacto de la fermentación.

7.3.1. Caracterización de los jugos de frutas/verduras

°Brix.

El fundamento de este método es la medición de sólidos solubles totales (principalmente azúcares) en una solución, mediante refractometría.

Procedimiento:

- Se calibró el refractómetro ajustando a 0 °Brix con agua destilada.
- La muestra se preparó filtrando la bebida de kéfir para eliminar sólidos en suspensión.
- La medición se realizó depositando 2 gotas del filtrado en el prisma del refractómetro.
- Se leyó directamente el valor en °Brix.

Expresión de resultados:

- Se reportó como °Brix a $20^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ (promedio de triplicados).

Azúcares reductores (Miller., 1959)

Su fundamento es la reducción del reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por azúcares reductores (ej. glucosa, fructosa), generando un compuesto rojo-anaranjado cuantificable a 540 nm.

Reactivos:

- Para preparar el reactivo se disolvió 1 g de DNS en 50 mL de agua destilada.
- Se añadieron 30 g de tartrato de sodio y potasio en 20 mL de NaOH 2 M.
- Se calentó a 50°C hasta disolución completa.
- Ajuste a 100 mL con agua destilada. Almacenar en ámbar.
- Se prepararon diluciones seriadas de una solución estándar de glucosa (0–10 mg/mL) para la curva de calibración.

Procedimiento:

- Para la preparación de la muestra se centrifugó la bebida (4000 rpm, 10 min) y recuperación del sobrenadante.
- Mezclamos 1 mL de muestra con 1 mL de reactivo DNS en tubos de ensayo.
- Se calentó en baño María a 90°C por 5 min.
- Se añadieron 10 mL de agua destilada.
- La absorbancia fue medida a 540 nm (espectrofotómetro Thermo Genesys 10).
- Blanco: Agua destilada + DNS, tratado igual que las muestras.

Cálculo:

- Curva de calibración: Recta de glucosa (0–10 mg/mL).
- Azúcares reductores (mg/mL) = Concentración interpolada × Factor de dilución.

7.3.2. Optimización:

Los gránulos de kéfir, previamente activados según el protocolo del punto 7.1.1, se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de medio de sacarosa y metabolitos residuales. Posteriormente, se escurrieron y se pesaron para su uso.

Una vez caracterizados los jugos, se estandarizó el proceso de inoculación añadiendo un 2% p/v (peso/volumen) de los gránulos de kéfir activos y lavados. Las mezclas se vertieron en recipientes de vidrio estériles de 250 mL, llenando cada uno hasta 100 mL para proveer espacio headspace suficiente y evitar derrames por la producción de CO₂. Los frascos se cubrieron con una doble capa de gasa estéril asegurada con una banda elástica para permitir el intercambio gaseoso (evitar la acumulación de CO₂) y prevenir la contaminación. Las muestras se mantuvieron en una estufa de incubación a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ en completa oscuridad durante los tiempos de fermentación establecidos: 24, 48 y 72 horas.

Cada variante (tipo de jugo x tiempo de fermentación) se preparó por triplicado para garantizar la reproducibilidad y permitir un análisis estadístico. Al finalizar cada intervalo de tiempo, el proceso fermentativo se detuvo mediante la filtración del contenido para retirar los gránulos de kéfir.

7.3.3. Evaluación sensorial inmediata: Prueba Tukey.

Para evaluar el impacto del tiempo de fermentación en la aceptabilidad de las bebidas de kéfir elaboradas con jugos de frutas y verduras, se estableció un diseño experimental donde la variable respuesta fue la aceptabilidad sensorial, medida mediante una escala hedónica de 7 puntos.

Un panel de 70 jueces no entrenados participó en la evaluación, realizada a través de formularios digitales estandarizados (*Google Forms*), donde se presentaron las muestras de forma aleatoria para evitar sesgos. Cada una de las bebidas —preparadas con jugos de

manzana, mango, zanahoria y naranja— fue evaluada en sus tres tiempos de fermentación (24, 48 y 72 horas), lo que permitió analizar cómo la duración del proceso afectaba la percepción del consumidor.

Los datos obtenidos se analizaron mediante una prueba de Tukey ($p < 0.05$), con el objetivo de identificar diferencias significativas entre los tratamientos. Este enfoque estadístico no solo permitió comparar la aceptabilidad entre los distintos jugos, sino también determinar el tiempo de fermentación óptimo para cada variedad, basado en las preferencias del panel.

7.3.4. Análisis post-selección (mejor sustrato):

7.3.4.1. Fisicoquímicos:

La caracterización de pH, acidez titulable, °Brix y azúcares reductores se realizó mediante los mismos métodos descritos en la Sección 7.2.2, empleando:

- Mismas condiciones instrumentales.
- Idénticos reactivos y estándares.
- Procedimientos de triplicado.

7.3.4.2. Recuento microbiano.

El recuento microbiano se realizó mediante los mismos métodos descritos en la Sección 7.2.6.3, empleando:

- Mismas condiciones instrumentales.
- Idénticos reactivos y estándares.
- Procedimientos de triplicado.

Fase 2. Diseño de bebida proteica

7.3.5. Adición variable del consorcio (2%, 5%, 10%).

Se utilizaron las bebidas de kéfir que obtuvieron la mayor aceptación sensorial en la etapa anterior (definida por el tiempo de fermentación).

El diseño de las bebidas proteicas se realizó mediante los mismos métodos descritos en la Sección 7.2.4, empleando:

- Mismas condiciones instrumentales.
- Procedimientos de triplicado.

7.3.6. Evaluación sensorial inmediata: Prueba Tukey.

La evaluación sensorial de las bebidas proteicas se realizó mediante los mismos métodos descritos en la Sección 7.2.5, empleando:

- Mismas condiciones instrumentales.

7.3.7. Caracterización de la fórmula seleccionada:

7.3.7.1. Bromatológico:

El análisis bromatológico de las bebidas proteicas con mayor aceptabilidad se realizó mediante los mismos métodos descritos en la Sección 7.2.6.1, empleando:

- Mismas condiciones instrumentales.
- Idénticos reactivos y estándares.
- Procedimientos de triplicado.

7.3.7.2. Actividad antioxidante:

El análisis de la actividad antioxidante de las bebidas proteicas con mayor aceptabilidad se realizó mediante los mismos métodos descritos en la Sección 7.2.6.2, empleando:

- Mismas condiciones instrumentales.

- Idénticos reactivos y estándares.
- Procedimientos de triplicado.

7.3.7.3. Recuento microbiano:

El recuento microbiano se realizó mediante los mismos métodos descritos en la Sección 7.2.6.3, empleando:

- Mismas condiciones instrumentales.
- Idénticos reactivos y estándares.
- Procedimientos de triplicado.

7.3.7.4. Fisicoquímicos:

La caracterización de pH, acidez titulable, °Brix y azúcares reductores se realizó mediante los mismos métodos descritos en la Sección 7.2.2, empleando:

- Mismas condiciones instrumentales.
- Idénticos reactivos y estándares.
- Procedimientos de triplicado.

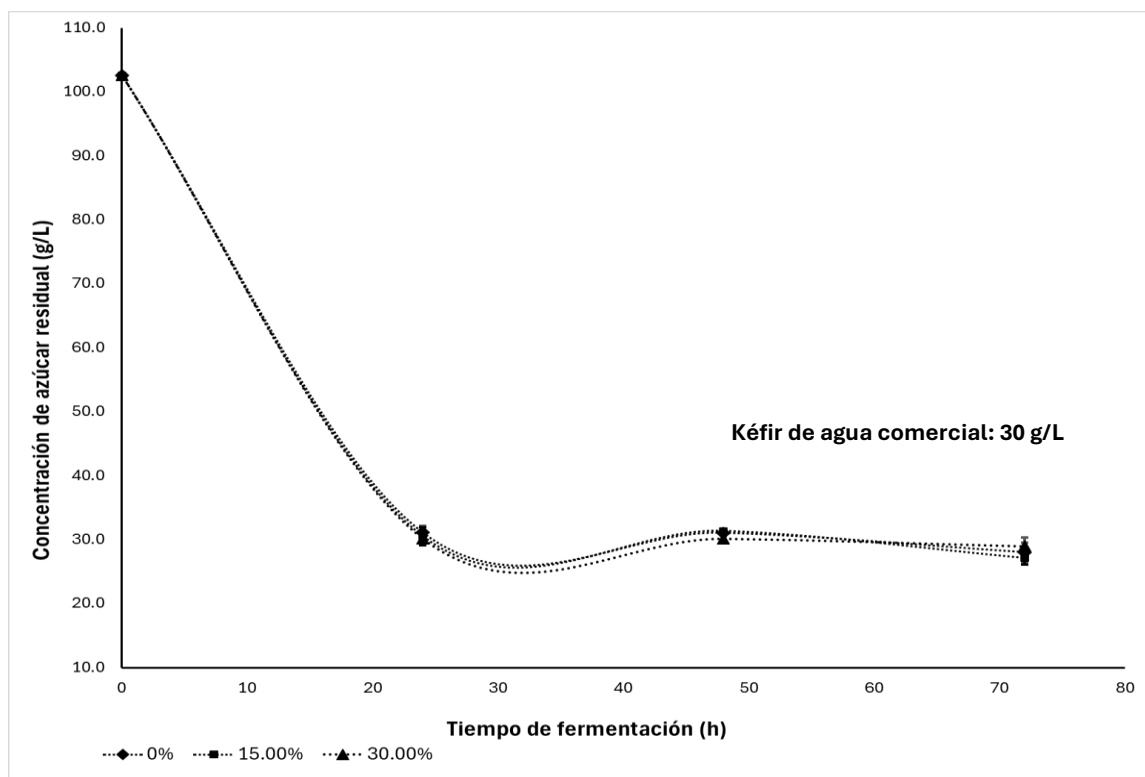
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Fermentación acuosa (Etapa 1)

8.1.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica (Fase 1)

- Azúcares residuales.

Se puede observar en la figura 14 que existe un consumo de azúcar constante durante las primeras 24 horas de la fermentación y se obtiene un máximo de reducción de azúcar de aproximadamente el 70% el cual no varía mucho con el tiempo de fermentación para todas las concentraciones de inóculo esto se muestra de manera más clara en la tabla 3. El contenido de azúcar residual del kéfir de agua comercial es similar al obtenido en nuestros resultados.



Reducción del volumen de operación (%)

Figura 14. Concentración de azúcar residual en las bebidas de kéfir con rvo.

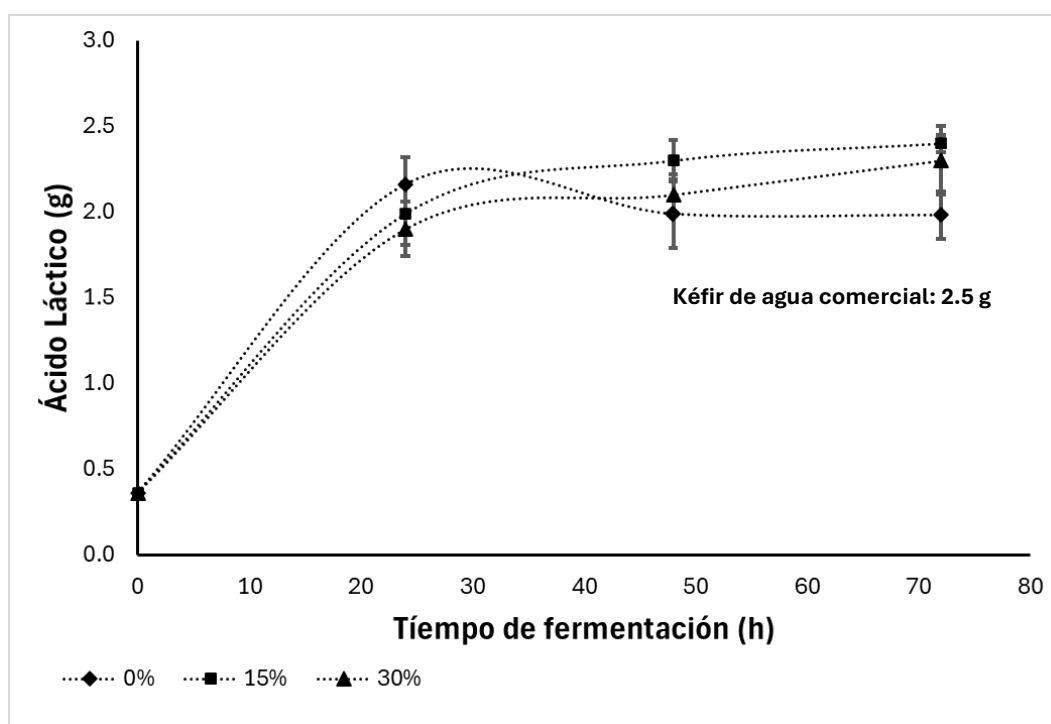
Tabla 3. Valores de la concentración de azúcar residual en las bebidas de kéfir con rvo.

Reducción del volumen de operación (%)	0h	24h	48h	72h
0%	102.62	31.13 ± 1.05	31.09 ± 0.41	28.05 ± 1.55
15.00%	102.62	30.58 ± 1.41	31.40 ± 0.23	27.16 ± 1.04
30.00%	102.62	30.20 ± 0.63	30.21 ± 0.40	29.01 ± 1.34

- Acidez titulable.

La figura 15 muestra un rápido aumento en la producción de ácido láctico durante las primeras 24 horas de fermentación para todos los porcentajes de rvo.

Después de las 24 horas, la tasa de producción de ácido láctico aumenta muy poco, con las curvas tendiendo a estabilizarse.

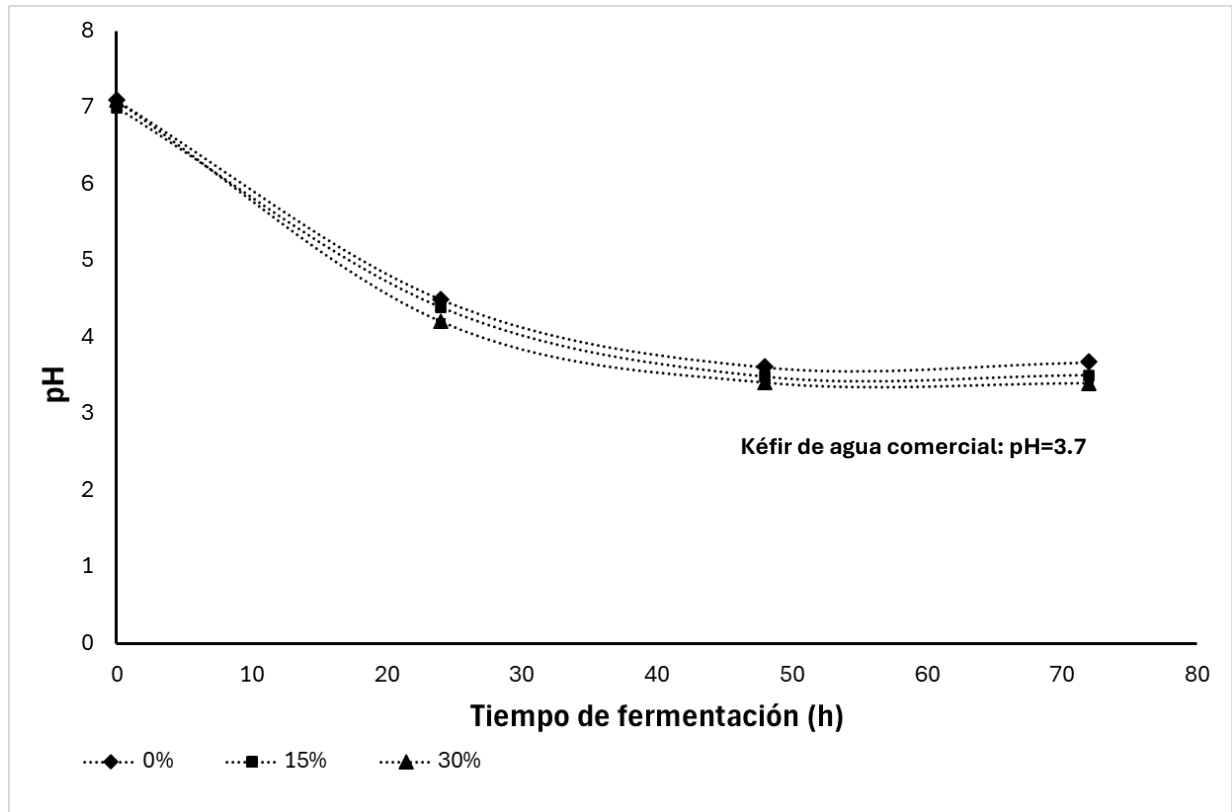


Reducción del volumen de operación (%)

Figura 15. Cantidad de ácido láctico total por unidad de bioproceso de las bebidas de kéfir con rvo.

- pH.

Relacionado con el aumento del porcentaje de acidez, el pH disminuye (Figura 16) y a las 48 se estabiliza entre 3.5 y 3.7. El pH del kéfir con rvo presenta un pH similar al kéfir de agua comercial que es de 3.7.



Reducción del volumen de operación (%)

Figura 16. pH de las bebidas de kéfir con rvo.

- Efecto de la reducción del volumen de operación sobre el porcentaje de proteína del kéfir.

En la figura 17 se puede observar el efecto de la reducción del volumen de operación sobre el porcentaje de proteína en el grano de kéfir. El análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) permitió establecer tres grupos de significancia. El tratamiento con 30% de rvo y 48 h de fermentación mostró el valor más alto, agrupándose de forma única (letra 'a'). La mayoría de los tratamientos a 24 y 48 h se agruparon

en un conjunto intermedio (letra 'b'), sin diferencias significativas entre ellos. Finalmente, los tratamientos de 72 h para 0% y 15% de reducción formaron un tercer grupo (letra 'c') con los valores más bajos entre los tiempos fermentados.

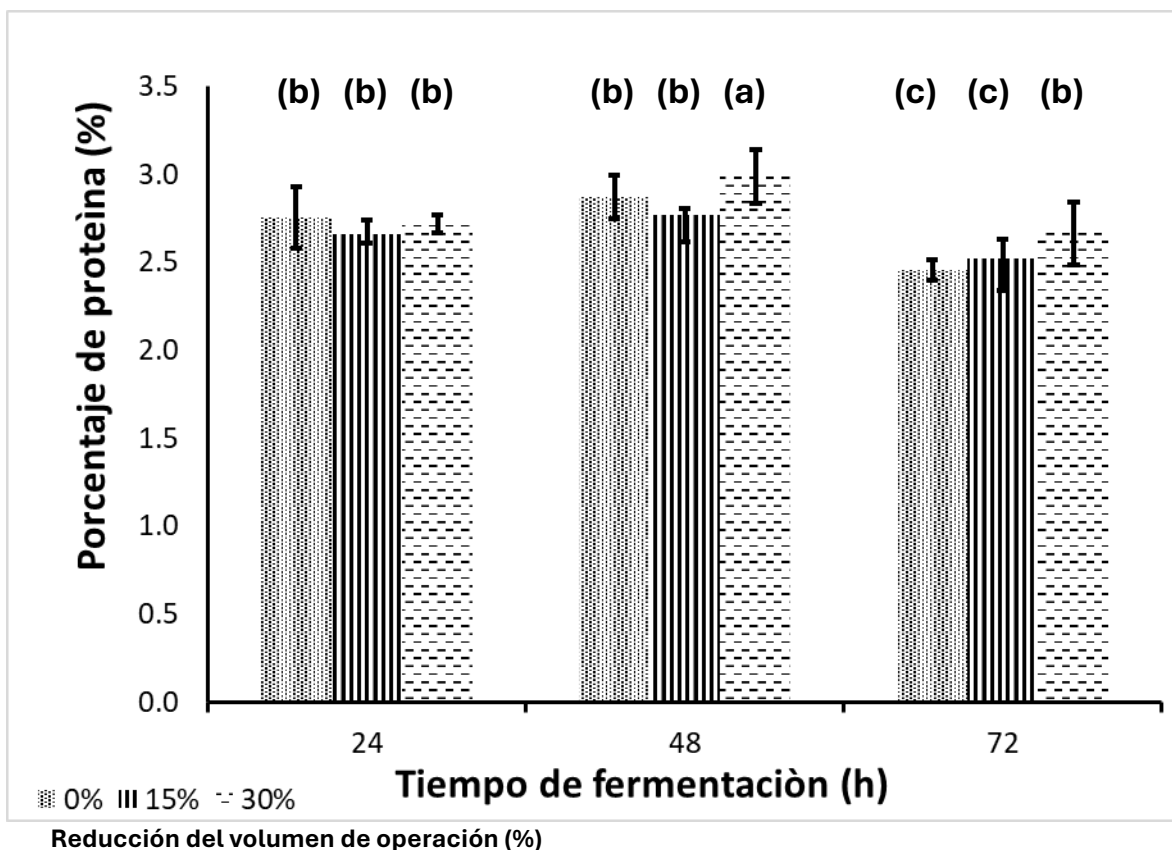


Figura 17. Efecto de la rvo sobre el porcentaje de proteína en el grano de kéfir.

Las letras sobre las barras indican grupos de significancia estadística ($p < 0.05$). Los tratamientos que comparten una misma letra no presentan diferencias significativas entre sí.

Los resultados demuestran que:

La rvo (hasta 30%) no altera significativamente la dinámica fermentativa del kéfir, coincidiendo con la estabilidad reportada por Laureys et al. (2016) en medios con diferentes relaciones C/N.

La proteína residual en granos podría depender más del tiempo de fermentación que de la concentración del sustrato, como propone Magalhães et al. (2011).

Los resultados de este trabajo revelan que los granos de kéfir de agua (típicos) presentaron un contenido proteico significativamente menor (2.8-2.9%) en comparación con lo reportado para granos de kéfir de leche (~34%) por Rosa et al. (2017).

Esta marcada diferencia puede explicarse por la composición de la matriz de cultivo dado que los granos de kéfir de leche desarrollan una estructura proteica más compleja, incorporando caseínas y proteínas del suero lácteo en su matriz de polisacáridos (Magalhães et al., 2011); en contraste, los granos de kéfir de agua crecen en medios acuosos con bajo aporte nitrogenado, limitando la síntesis de biomasa microbiana proteica (Laureys & De Vuyst, 2014).

Las diferencias microbianas también pueden ser una explicación debido a que el kéfir de leche alberga comunidades bacterianas (ej: *Lactobacillus kefirianofaciens*) con alta capacidad productora de proteínas asociadas a gránulos (Prado et al., 2015). Sin embargo los granos de kéfir de agua presentan mayor predominio de levaduras (ej: *Saccharomyces*) y bacterias acéticas, cuya composición celular es menos rica en proteínas (Fiorda et al., 2017).

Encontramos que el 30% de rvo aumentó levemente el contenido proteico, sugiriendo que la concentración del medio estimula modestamente la actividad microbiana. Sin embargo, este incremento fue significativamente menor al documentado en kéfir lácteo bajo condiciones similares (Zhou et al., 2022), reforzando las limitaciones nutricionales intrínsecas del medio acuoso.

8.1.2. Selección de la mejor variante (evaluación sensorial).

- Puntuaciones de aceptabilidad por rvo (0%, 15%, 30%) y tiempo (24-72 h).

Se presenta el gráfico de superficie de respuesta en la figura 18, el cual muestra que, para obtener la máxima aceptabilidad del kéfir,

deberíamos apuntar a un tiempo de fermentación de alrededor de 48 horas y una reducción del volumen de operación del 30% cuando la concentración de azúcar se mantiene en 10%.

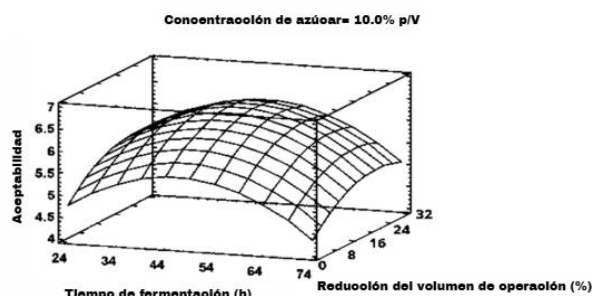


Figura 18. Superficie de respuesta de la aceptabilidad del kéfir con rvo.

Donde la ecuación para la aceptabilidad fue la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Aceptabilidad} = & -2.645726 + 0.1656587 * \text{Tiempo} + 2.241763 * \text{Reducción de} \\ & \text{volumen de operación} - 0.0009114583 * \text{Tiempo}^2 - \\ & 0.0288012 * \text{Tiempo} * \text{Reducción de volumen de operación} \end{aligned}$$

Así mismo el ANOVA del modelo de regresión para la aceptabilidad y su R^2 se observan en la figura 19.

Source	df	Sequential Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio
Regression	4	66.55325	16.63831	12.92
Linear	2	35.91818	17.95909	13.95
Quadratic	1	22.05	22.05	17.13
Lin x Lin	1	8.585062	8.585062	6.67
Total Error	355	457.0468	1.287456	
Lack of Fit	4	2.646757	0.6616893	0.51
Pure Error	351	454.4	1.294587	

$$R^2 = 0.127107$$

Figura 19. ANOVA del modelo de regresión para la aceptabilidad del kéfir con rvo.

A continuación, se discuten los factores que podrían explicar esta preferencia:

Efecto de la reducción del volumen de operación (30%) en la aceptabilidad

- Mayor intensidad de sabor: La rvo incrementa la concentración relativa de metabolitos (ácido láctico, compuestos aromáticos), lo que podría mejorar el perfil sensorial. Estudios en bebidas fermentadas similares, como la kombucha, han reportado que una menor dilución del medio favorece la producción de compuestos volátiles deseables (Chakravorty et al., 2019).
- Balance azúcar/acidez: Aunque el 30% de reducción no alteró significativamente el consumo de azúcares (Resultados 8.1.1), sí generó un perfil más equilibrado entre dulzor y acidez, evitando la predominancia de sabores agresivos (ej.: acidez excesiva a 72 h).

Influencia del Tiempo de Fermentación

- Óptimo metabólico: Las 48 h representan un punto de equilibrio donde:
 - Las bacterias ácido lácticas (BAL) han consumido suficientes azúcares para producir ácido láctico, pero sin llegar a niveles de sobre fermentación (asociada a sabores demasiado ácidos o amargos).
 - Las levaduras contribuyen con compuestos aromáticos (ej.: ésteres) sin producir etanol en exceso, lo que podría ser rechazado por consumidores (Laureys & De Vuyst, 2014).
- Consistencia con estudios previos: Trabajos en kéfir de agua han identificado que tiempos intermedios (24–48 h) maximizan la aceptabilidad, mientras que fermentaciones prolongadas (>72 h) tienden a ser percibidas como "demasiado ácidas" (Fiorda et al., 2017).

El modelo de superficie de respuesta evidenció que:

- La reducción del volumen de operación potencia el efecto del tiempo de fermentación: A mayor concentración del medio (30% menos agua), las 48 h son suficientes para alcanzar un perfil

sensorial óptimo, mientras que en medios diluidos (0% reducción) se requiere más tiempo para lograr intensidad de sabor.

- Estabilidad microbiana: A las 48 h, la comunidad microbiana (BAL/levaduras) alcanza una composición estable, lo que coincide con la menor variabilidad en las puntuaciones hedónicas para este tratamiento.

8.1.3. Bebida proteica optimizada (Fase 2)

- Aceptabilidad del kéfir proteínico con rvo.

La figura 20 muestra por la prueba Tukey que existe diferencia significativa en entre el kéfir con 2.5% de proteína mas no entre los que contienen 3.5% y 5% de proteína.

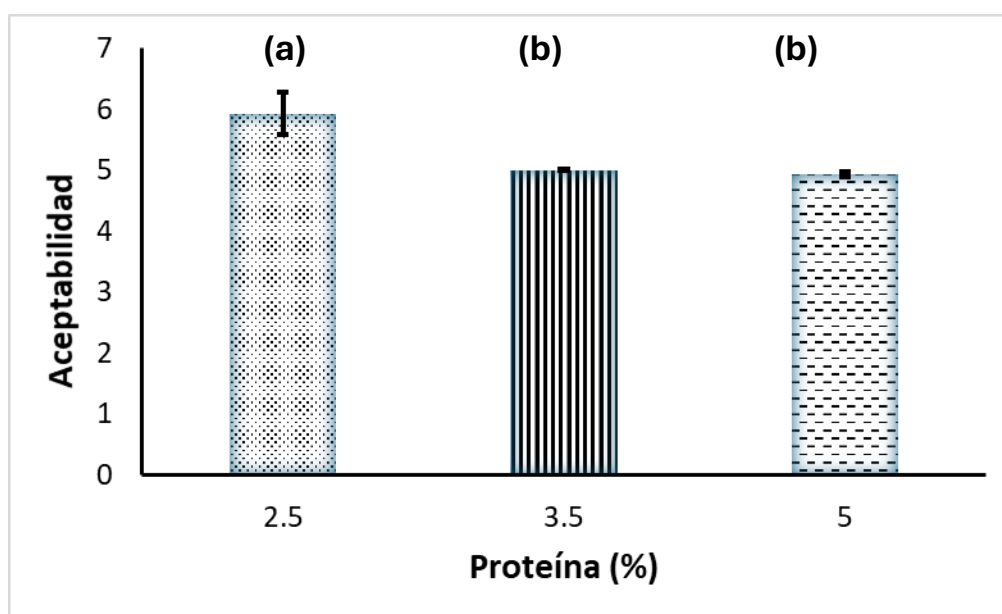


Figura 20. Aceptabilidad del kéfir proteínico 30% rvo, con 48 h de fermentación.

- Análisis bromatológico en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.

El análisis bromatológico (Tabla 4) mostró diferencias significativas entre el kéfir de agua control y el kéfir con reducción del 30% en volumen de agua (fermentado 48 h) con proteína. La muestra con rvo presentó

contenido de proteína significativamente mayor al kéfir de agua control. (2.626% vs. 0.175% en el control).

Tabla 4. Cuadro comparativo del análisis bromatológico en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.

PRUEBA	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteínas (%)	Extracto etéreo (%)	Fibra cruda (%)	Extracto libre de nitrógeno (%)
KÉFIR DE AGUA CONTROL	96.562±0.164 ^a	0.151±0.031 ^a	0.175±0.000 ^b	0.022±0.020 ^b	0.044±0.029 ^b	3.047±0.165 ^b
KÉFIR CON 30% RVO (48 h)	93.022±0.142 ^b	0.160±0.055 ^a	2.626±0.000 ^a	0.133±0.064 ^a	0.322±0.127 ^a	3.701±0.074 ^a

Letras diferentes (^{a,b}) dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

- Análisis físico-químico en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.

Como se observa en la tabla 5, el azúcar residual entre ambas muestras es similar (~2.6–2.8 g/100 mL). Los azúcares reductores fueron detectados solo en el kéfir con rvo (0.002 g/100 mL).

El pH y la acidez titulable se mantuvieron similares.

Tabla 5. Cuadro comparativo de las propiedades fisicoquímicas en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.

PRUEBA		KÉFIR DE AGUA CONTROL	KÉFIR CON 30% RVO (48 h)
Azúcar residual (g/ 100 mL)		2.8273±0.344	2.5979±1.155
Azúcares reductores (g/100 mL)	SP	0.002±0.000	0.002±0.000
	CP		0.002±0.000
pH		3.687±0.012	3.307±0.012
Acidez titulable (% en meq de ácido láctico)		2.886±0.045	2.883±0.016

SP: Sin adición de proteína | CP: Con adición de proteína al 2.5%.

- Recuento microbiano en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.

Tabla 6. Cuadro comparativo de la actividad microbiana en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.

PRUEBA		Levaduras	BAL
KÉFIR DE AGUA CONTROL		$9.9 \times 10^4 \pm 35.3$	$1.42 \times 10^5 \pm 43.5$
SP	KÉFIR CON 30% RVO (48 h)	$1.3 \times 10^5 \pm 5.4$	$9.4 \times 10^5 \pm 12.8$
CP		$8.57 \times 10^6 \pm 7.1$	$1.20 \times 10^7 \pm 15.5$

SP: Sin adición de proteína | CP: Con adición de proteína al 2.5%.

BAL: Bacterias Ácido Lácticas.

Los valores representan el recuento microbiano (UFC/mL) $\pm$ desviación estándar.

- Actividad antioxidante en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.

Tabla 7. Cuadro comparativo de la actividad antioxidante en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.

PRUEBA		Polifenoles totales (meq ac gálico/L)	Inhibición del radical DPPH (%)	Inhibición del radical ABTS (%)
KÉFIR DE AGUA CONTROL		8.753 ± 3.946^b	54.846 ± 2.443^b	29.586 ± 2.574^a
SP	KÉFIR REDUCIDO 30% EN AGUA (48 h)	23.353 ± 0.462^a	73.209 ± 3.293^a	24.28 ± 15.401^a
CP		25.153 ± 0.306^a	74.112 ± 4.484^a	24.202 ± 6.323^a

SP: Sin adición de proteína | CP: Con adición de proteína al 2.5%.

Letras diferentes (^a, ^b) dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

El kéfir con rvo mostró un aumento en polifenoles totales (23.353–25.153 meq AG/L) frente al control (8.753 meq AG/L).

Mayor inhibición en el kéfir con rvo en cuanto a inhibición del radical DPPH (73.209–74.112% vs. 54.846% en el control).

Sin diferencias significativas en cuanto a inhibición del radical ABTS entre muestras (Tabla 7).

Los resultados demostraron que la máxima aceptabilidad se obtuvo en el kéfir con 2.5% de proteína añadida, sin diferencias significativas entre las concentraciones de 3.5% y 5%. Este hallazgo coincide con estudios previos que señalan que niveles moderados de proteína (2–3%) optimizan la percepción sensorial en bebidas fermentadas, mientras que concentraciones más altas pueden generar sabores residuales amargos o texturas gelatinosas (Wróblewska et al., 2019). La preferencia por el 2.5% sugiere un equilibrio entre el enriquecimiento nutricional y la palatabilidad, similar a lo reportado en yogures proteicos (Gómez-Mascaraque et al., 2020).

El kéfir reducido en un 30% del volumen de operación mostró un aumento significativo en proteína (2.626% vs. 0.175%), lo que podría atribuirse a:

- Mayor concentración de metabolitos microbianos: La menor dilución del medio favorece la acumulación de biomasa y exopolisacáridos producidos por los granos de kéfir (Rimada et al., 2006).
- Efecto de la proteína añadida: La incorporación de proteína externa (ej.: hidrolizados) en un medio concentrado potencia su retención en la matriz final, como se observa en bebidas vegetales fermentadas (Zannini et al., 2018).

Sin embargo, el contenido de fibra cruda (0.882%) y extracto etéreo (0.406%) también aumentó, indicando que la reducción del volumen de operación intensifica la extracción de componentes estructurales de los granos, fenómeno documentado en kéfir de leche bajo condiciones similares (Magalhães et al., 2011).

El incremento en polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH: ↑34%) en el kéfir con reducción del volumen de operación respalda hallazgos previos sobre la correlación entre concentración del medio y producción de compuestos bioactivos:

- Polifenoles: La menor dilución favorece la liberación de fenoles ligados a la matriz de los granos, proceso observado en kéfir de frutas (Prado et al., 2015).
- DPPH: La mayor inhibición podría relacionarse con la acumulación de péptidos bioactivos generados durante la fermentación proteica (Zhou et al., 2022).

8.2. Fermentación en jugos de frutas/verduras (Etapa 2)

8.2.1. Caracterización de los jugos de frutas/verduras (Fase 1)

- °Brix.

Los valores reflejados en la figura 21 indican las diferencias naturales en el contenido de azúcares y otros compuestos solubles entre las materias primas.

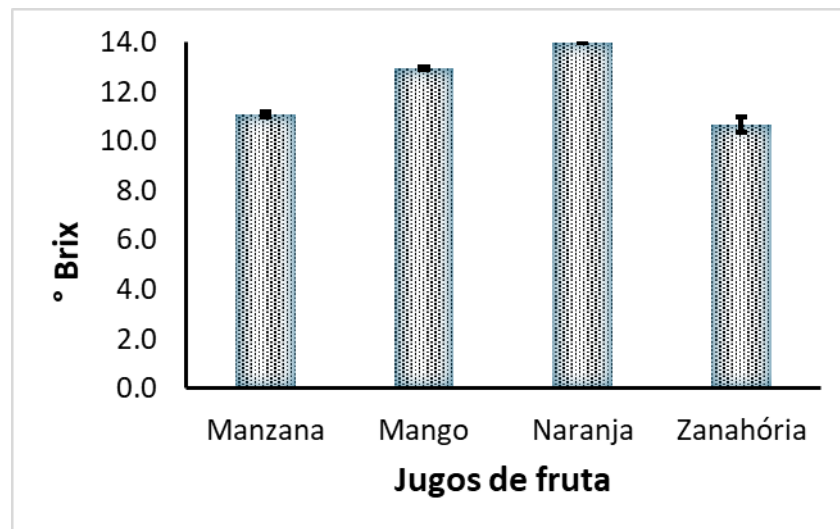


Figura 21. Concentración de sólidos solubles en los jugos de fruta.

- Azúcares reductores.

En cuanto a la concentración de azúcares reductores (g/100 mL) la pulpa de mango obtuvo el valor más alto y la zanahoria el más bajo (Figura 22).

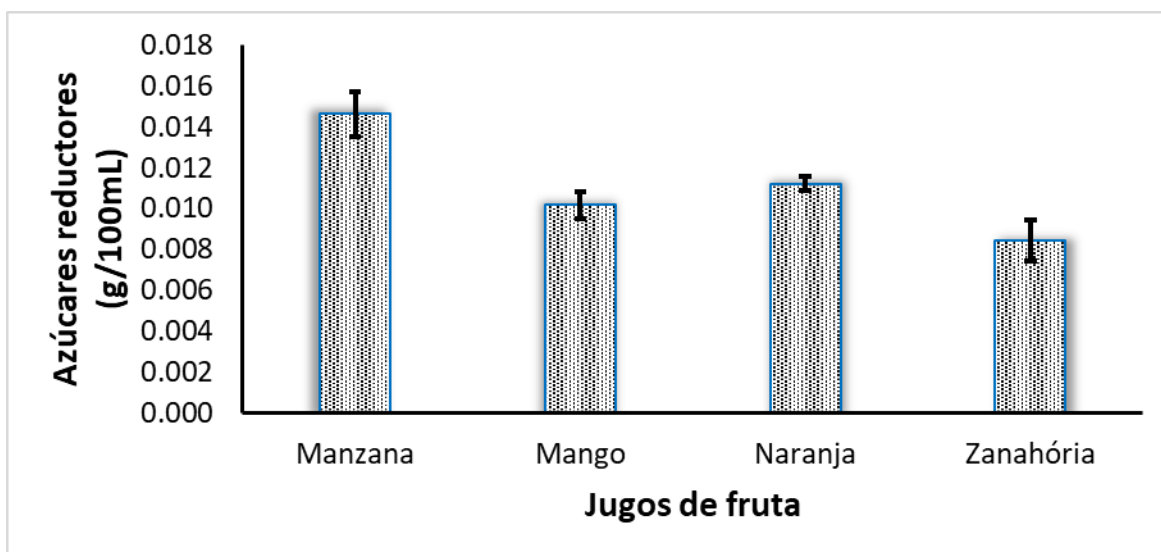


Figura 22. Concentración de azúcares reductores en los jugos de fruta.

8.2.2. Selección de sustrato óptimo (evaluación sensorial)

- Aceptabilidad del kéfir de jugos de fruta no proteínicos.

Los resultados de la evaluación sensorial (Figuras 23-26), analizados mediante prueba de Tukey ($p < 0.05$), revelaron diferencias significativas en la aceptabilidad entre los tiempos de fermentación (24, 48 y 72 h) para la mayoría de los jugos evaluados.

En el Kéfir de manzana, mango y naranja se observaron diferencias significativas entre las medias de los tres tiempos de fermentación, siendo las muestras de 24 h las mejor puntuadas.

En cuanto al Kéfir de zanahoria no se detectaron diferencias significativas entre las muestras fermentadas por 24 h y 48 h, aunque sí hubo un descenso notable en la aceptabilidad a las 72 h.

Para homogenizar el proceso y priorizar la mayor aceptabilidad sensorial, se seleccionó el tiempo de 24 h de fermentación para todas las variedades de kéfir de jugos.

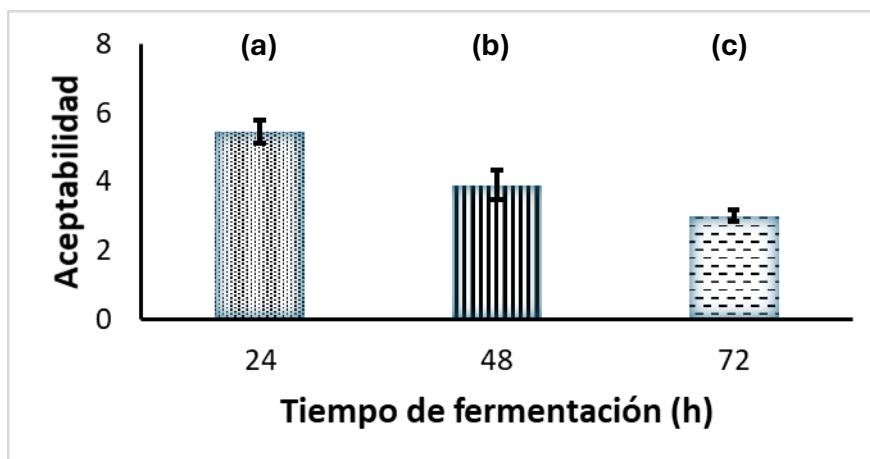


Figura 23. Aceptabilidad del kéfir de jugo de manzana no proteínico con respecto al tiempo.

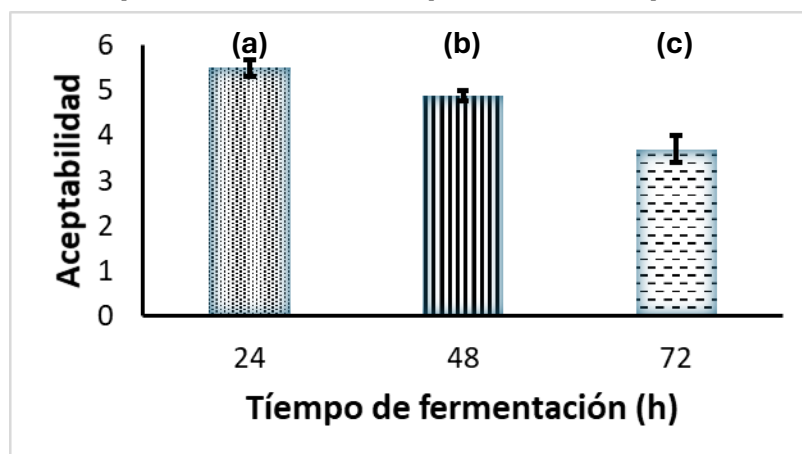


Figura 24. Aceptabilidad del kéfir de jugo de mango no proteínico con respecto al tiempo.

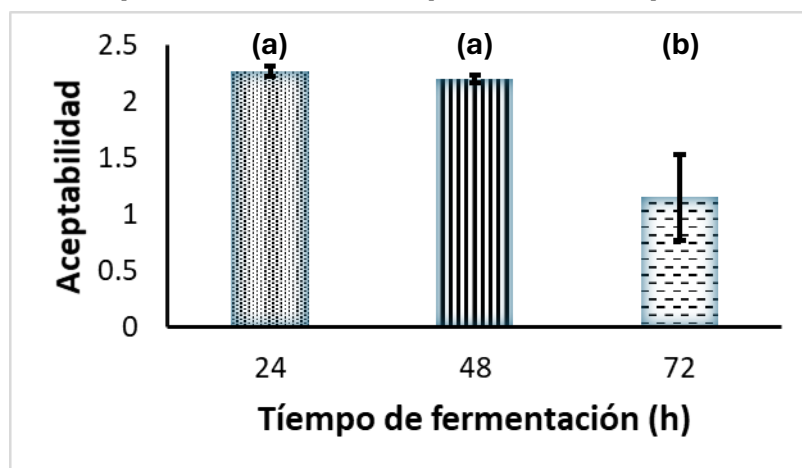


Figura 25. Aceptabilidad del kéfir de jugo de zanahoria no proteínico con respecto al tiempo.

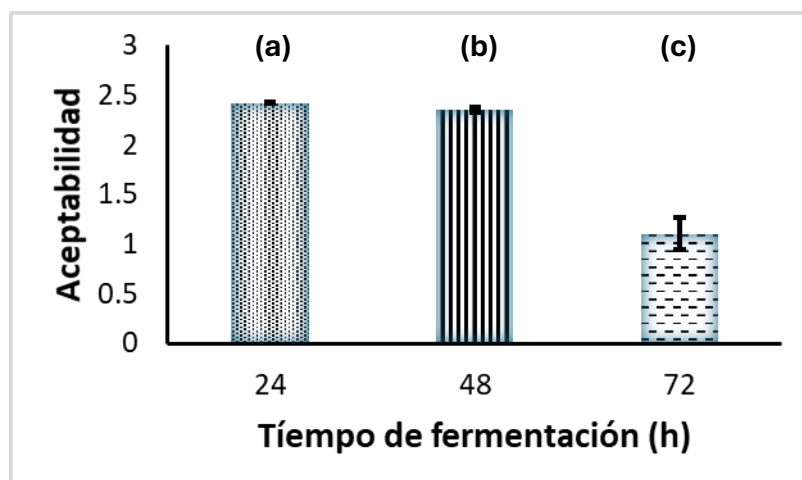


Figura 26. Aceptabilidad del kéfir de jugo de naranja no proteínico con respecto al tiempo.

Como se puede observar, la aceptabilidad fue mucho menor en las bebidas de kéfir de jugos de naranja y zanahoria.

Los resultados revelan una clara relación entre el perfil de azúcares naturales de los jugos (grados Brix y azúcares reductores) y la aceptabilidad sensorial de los kéfirs fermentados. Esta influencia puede explicarse mediante tres factores clave:

- Concentración de azúcares y balance sensorial

Fermentaciones equilibradas en kéfirs de manzana y mango, donde los azúcares residuales mitigaron la acidez excesiva, favoreciendo la aceptabilidad. Esto coincide con estudios en kéfir de frutas, donde contenidos de 12–15°Brix optimizan el perfil dulzor/acidez (Prado et al., 2015).

A pesar del alto contenido en °Brix del jugo de naranja, la baja aceptabilidad sugiere que los azúcares naturales (principalmente sacarosa) no compensaron la acidez intrínseca del jugo, que se intensificó con la fermentación (pH final: ~3.2).

La menor cantidad de azúcares en el jugo de zanahoria llevó a una fermentación menos activa, con sabores terrosos predominantes y

menor producción de compuestos aromáticos, lo que podría explicar su baja puntuación.

- Tipo de azúcares y dinámica fermentativa

Los azúcares fácilmente fermentables (glucosa, fructosa) en mango aceleraron la producción de ácido láctico y aromas deseables (notas tropicales), como reportan Laureys & De Vuyst (2014) en medios ricos en fructosa.

En el kéfir de jugo de zanahoria, la baja concentración de azúcares reductores limitó la actividad microbiana, resultando en sabores "apagados". El kéfir de jugo de mango, rico en fructosa, favoreció rutas metabólicas que producen aromas frutales (acetato de isoamilo), vinculados a mayor aceptación (Zhou et al., 2022).

- Interacción con el tiempo de fermentación

La corta fermentación (24 h) preservó los azúcares residuales para balance sensorial, evitando la sobreproducción de ácido. La prolongación de la fermentación agotó los ya escasos azúcares, acentuando sabores ácidos/amargos (Gulitz et al., 2011).

8.2.3. Análisis comparativos post-selección

- Azúcares residuales.

Los kéfires de mango y manzana (Figura 27) mostraron los mayores niveles de azúcares residuales (~3.5-4.0 g/100 mL), indicando una fermentación parcial debido a su alto contenido inicial de azúcares (16°Brix y 10°Brix, respectivamente).

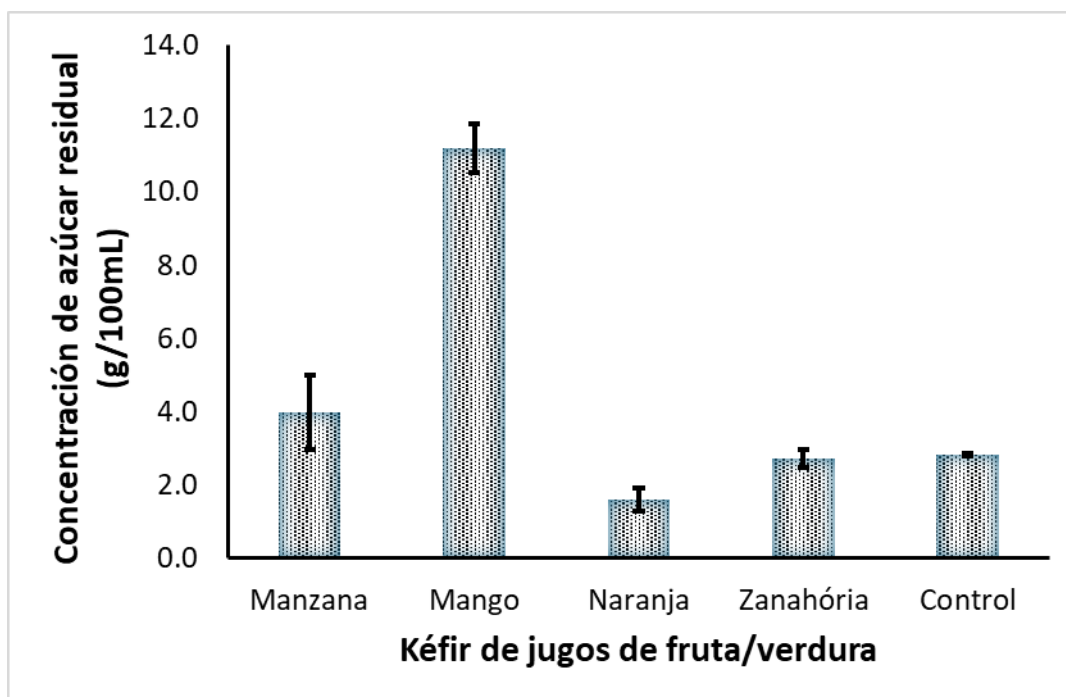


Figura 27. Concentración de azúcar residual en las bebidas de kéfir de jugos de frutas / verduras.

- Acidez titulable.

Contrario a lo esperado, la acidez titulable (Figura 28), expresada como porcentaje de ácido láctico, fue menor en el kéfir de zanahoria en comparación con las otras muestras. En cambio, los kéfirs de mango y naranja, con una mayor acidez titulable, presentan un perfil dominado por ácido láctico.

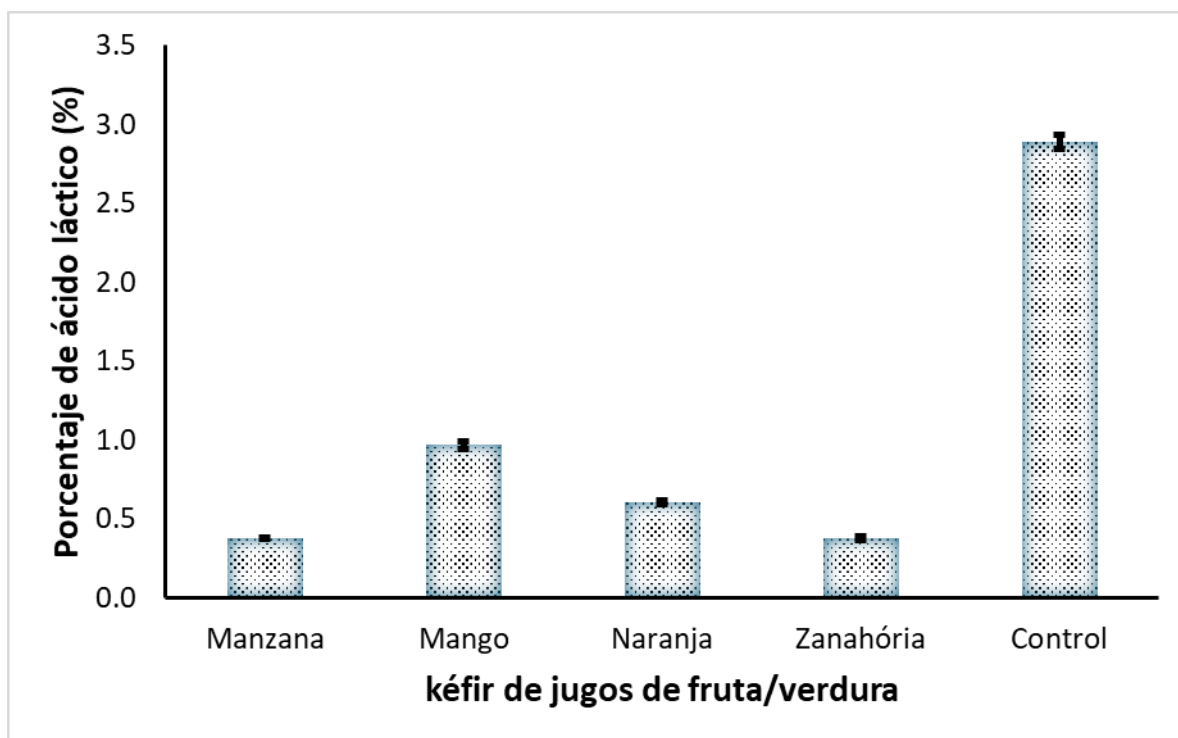


Figura 28. Acidez titulable en las bebidas de kéfir de jugos de frutas / verduras.

- pH.

El kéfir con base en jugo de zanahoria fue percibido por los panelistas como el de sabor más ácido y amargo durante la evaluación sensorial, a pesar de que las mediciones instrumentales mostraron que presentaba el pH más alto (~4.6) entre las muestras (Figura 29). Por el contrario, los kéfirs de mango y manzana, con un pH más bajo (entre 3.6-3.8), fueron considerados como los de acidez equilibrada y de mayor aceptabilidad.

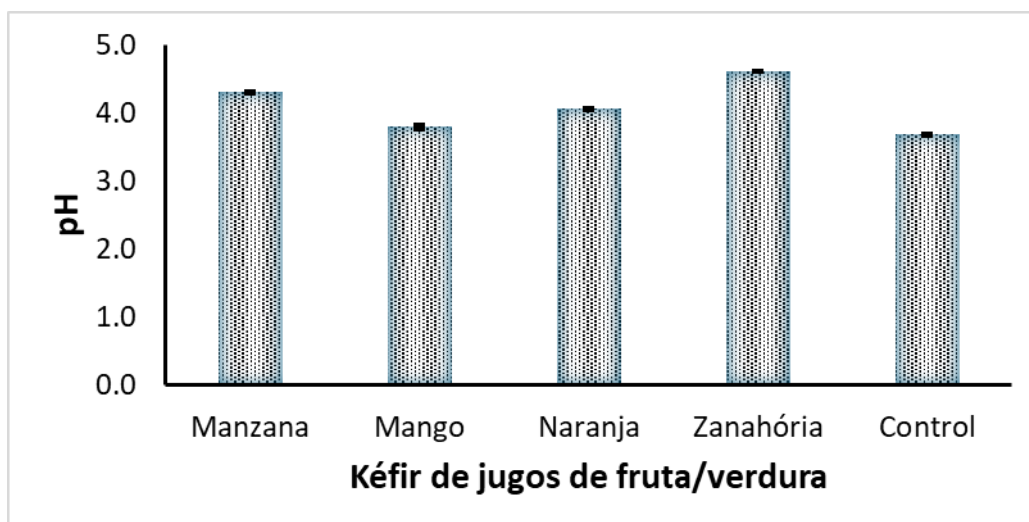


Figura 29. pH de las bebidas de kéfir de jugos de frutas / verduras.

Los patrones observados confirman que:

El perfil de azúcares naturales determina la cinética fermentativa, es decir, medios ricos en fructosa/glucosa (mango) favorecen fermentaciones balanceadas (Laureys et al., 2016). Bajos °Brix (zanahoria) conducen a fermentaciones rápidas y sobreexpresión de acidez (Rosa et al., 2017).

Los sabores acéticos en zanahoria sugieren predominio de *Acetobacter*, común en medios con limitación de azúcares (Fiorda et al., 2017). Los jugos con 10-15°Brix (mango/manzana) son óptimos para kéfir equilibrado.

8.2.4. Bebida proteica optimizada (Fase 2)

- Aceptabilidad del kéfir de jugos de fruta proteínicos.

Para las figuras de aceptabilidad de kéfir proteínico en los jugos de frutas/verduras (Figuras 30-33), se observa que esta disminuyó al aumentar la proteína (5%). Las bebidas de manzana y mango mostraron mayor aceptabilidad que naranja y zanahoria en todos los niveles. Letras distintas (a, b, c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$, prueba Tukey).

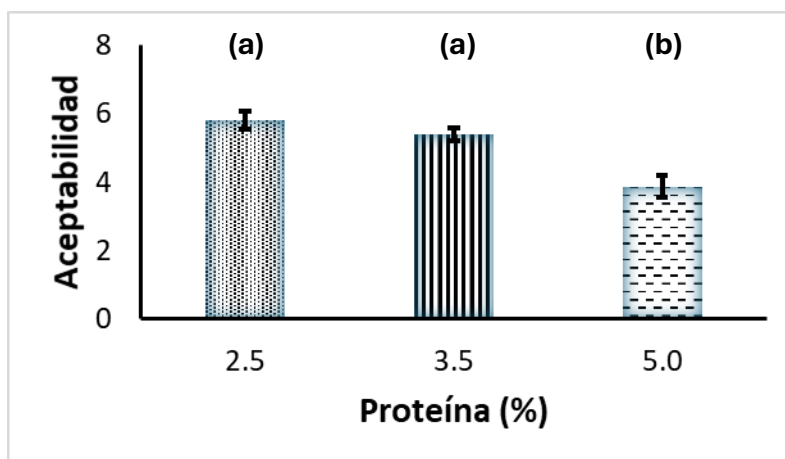


Figura 30. Aceptabilidad del kéfir proteínico de jugo de manzana.

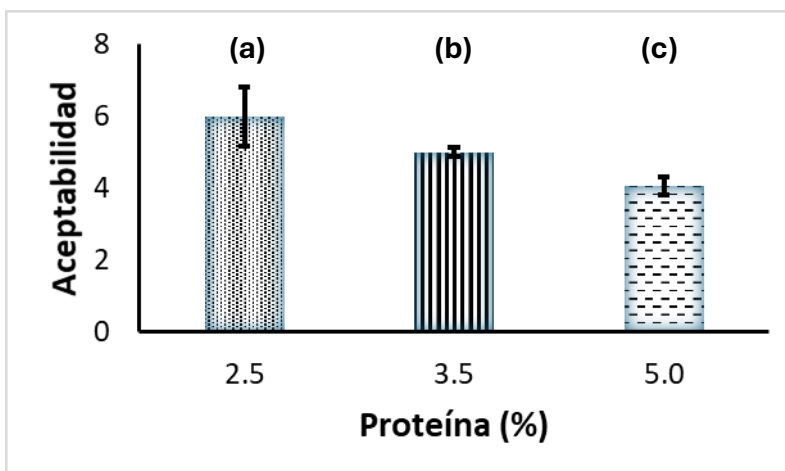


Figura 31. Aceptabilidad del kéfir proteínico de jugo de mango.

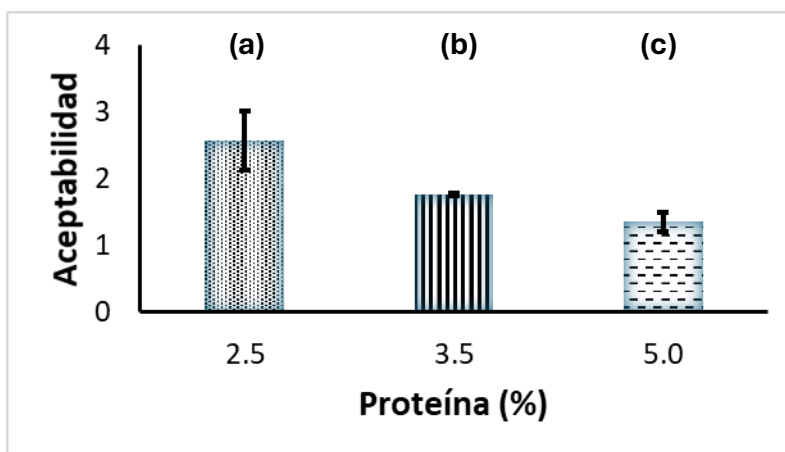


Figura 32. Aceptabilidad del kéfir proteínico de jugo de zanahoria.

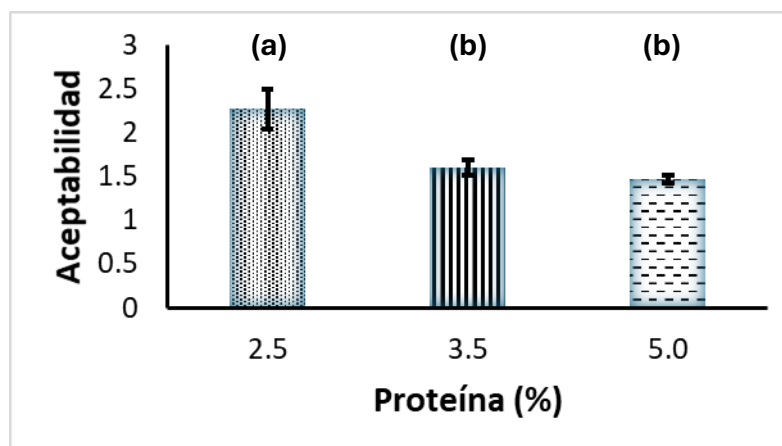


Figura 33. Aceptabilidad del kéfir proteínico de jugo de naranja.

- Análisis bromatológico en los kéfires proteínicos de mayor aceptabilidad.

Se puede observar en la tabla 8 que el porcentaje de proteínas es significativamente mayor en los kéfires de jugos de frutas/verduras, adicionados con consorcio microbiano (~2.5%) que en el kéfir control (~0.175%). En los kéfires de jugos de frutas/verduras, adicionados con consorcio microbiano también se puede observar una mayor concentración de nutrientes. El kéfir de mango es el más destacado en términos de composición global.

Tabla 8. Cuadro comparativo del análisis bromatológico en los kéfires de jugos de frutas / verduras, proteínicos de mayor aceptabilidad.

PRUEBA	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteínas (%)	Extracto etéreo (%)	Fibra cruda (%)	Extracto libre de nitrógeno (%)
KÉFIR DE AGUA CONTROL	96.562±0.164 ^a	0.151±0.031 ^c	0.175±0.000 ^c	0.022±0.020 ^c	0.044±0.029 ^c	3.047±0.165 ^c
KÉFIR DE JUGO DE MANZANA (24 h)	91.700±0.284 ^b	0.258±0.196 ^{b,c}	2.451±0.202 ^b	0.684±0.061 ^a	1.321±0.183 ^a	3.751±0.153 ^c
KÉFIR DE JUGO DE MANGO (24 h)	82.313±0.221 ^d	0.477±0.261 ^b	3.035±0.101 ^a	0.532±0.032 ^b	1.329±0.026 ^a	12.313±0.031 ^a
KÉFIR DE JUGO DE ZANAHORIA (24 h)	93.806±0.384 ^b	0.670±0.059 ^a	2.393±0.202 ^b	0.442±0.037 ^c	0.322±0.116 ^b	2.367±0.223 ^d
KÉFIR DE JUGO DE NARANJA (24 h)	94.602±0.306 ^b	0.220±0.060 ^{b,c}	2.335±0.101 ^b	0.501±0.042 ^{b,c}	0.657±0.183 ^b	1.685±0.597 ^d
Valor F	2845.2	4.8	471.5	97.3	76.4	1082.5
Valor P	< 0.001	0.019	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Letras diferentes (^{a, b, c, d}) dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar.

- Análisis físico-químico en los kéfires proteínicos de mayor aceptabilidad.

Como se muestra en la tabla 9, el kéfir de mango (24 h) tiene la mayor concentración de azúcar residual (11.193 g/100 mL), pero baja acidez (0.967%) comparado con el control.

Todos los kéfires con proteína mostraron pH menos ácido (3.797–4.610) vs. control (3.687), excepto mango (3.797).

La acidez disminuyó drásticamente en los kéfires con proteína, especialmente en manzana y zanahoria.

Tabla 9. Cuadro comparativo del análisis fisicoquímico en los kéfires de jugos de frutas / verduras, proteínicos de mayor aceptabilidad.

PRUEBA		KÉFIR DE AGUA CONTROL	KÉFIR DE JUGO DE MANZANA (24 h)	KÉFIR DE JUGO DE MANGO (24 h)	KÉFIR DE JUGO DE ZANAHORIA (24 h)	KÉFIR DE JUGO DE NARANJA (24 h)
Azúcar residual (g/ 100 mL)		2.827±0.344	3.970±1.007	11.193±0.65	2.719±0.239	1.597±0.308
Azúcares reductores	Jugos de fruta	0.002±0.000	0.015±0.001	0.010±0.001	0.008±0.001	0.011±0.000
	Kéfires con proteína		0.005±0.000	0.003±0.001	0.002±0.001	0.004±0.001
pH		3.687±0.012	4.313±0.006	3.797±0.025	4.610±0.000	4.063±0.012
Acidez titulable (% en meq de ácido láctico)		2.886±0.045	0.375±0.005	0.967±0.023	0.375±0.010	0.607±0.014

- Recuento microbiano en el kéfir proteínico de mayor aceptabilidad.

El kéfir de agua control presentó recuentos bajos tanto de levaduras (9.9×10^4 UFC/mL) como de bacterias ácido lácticas (BAL, 1.42×10^5 UFC/mL). En contraste, los kéfires elaborados con jugos de frutas/verduras mostraron diferencias significativas según el sustrato y la adición de proteína (Tabla 10).

Tabla 10. Cuadro comparativo del recuento microbiano en los kéfires de jugos de frutas / verduras, proteínicos de mayor aceptabilidad.

PRUEBA		Levaduras (UFC/mL)	BAL (UFC/mL)
KÉFIR DE AGUA CONTROL		$9.9 \times 10^4 \pm 35.3$	$1.42 \times 10^5 \pm 43.5$
SP	KÉFIR PROTEÍNICO DE	$0.52 \times 10^5 \pm 16.5$	$9.04 \times 10^4 \pm 5.56$
CP	MANZANA	$6.6 \times 10^6 \pm 11.8$	$7.97 \times 10^6 \pm 24.2$
SP	KÉFIR PROTEÍNICO DE	$4.38 \times 10^5 \pm 6.1$	$7.5 \times 10^5 \pm 16.8$
CP	MANGO	$1.62 \times 10^7 \pm 16.2$	$1.91 \times 10^7 \pm 6.4$
SP	KÉFIR PROTEÍNICO DE	$9.2 \times 10^5 \pm 21.4$	$8.52 \times 10^5 \pm 23.5$
CP	ZANAHORIA	$1.23 \times 10^7 \pm 42.1$	$1.23 \times 10^7 \pm 36.1$
SP	KÉFIR PROTEÍNICO DE	$0.18 \times 10^5 \pm 8.3$	$9.5 \times 10^5 \pm 11.4$
CP	NARANJA	$8.9 \times 10^6 \pm 26.3$	$2.02 \times 10^7 \pm 16.8$

SP: Sin adición de proteína. CP: Con adición de proteína al 2.5%.

BAL: Bacterias Ácido Lácticas.

Los valores representan el recuento microbiano (UFC/mL) $\pm$ desviación estándar.

Por ejemplo, en los kéfires sin proteína (SP) manzana obtuvo un recuento moderado de levaduras (0.52×10^5 UFC/mL) y bajo en BAL (9.04×10^4 UFC/mL).

En la mayoría de los casos, la adición de proteína (CP) incrementó significativamente los recuentos microbianos, particularmente para BAL.

- Actividad antioxidante en los kéfires proteínicos de mayor aceptabilidad.

El kéfir de mango presentó los valores más altos de polifenoles totales, tanto en SP (45.953 ± 8.401 meq AG/L) como en CP (56.620 ± 5.048 meq AG/L), mostrando un incremento del 23% con la adición de proteína. El kéfir de naranja presentó los valores más bajos (15.020 ± 6.245 meq AG/L en CP), aunque superando al control (8.753 ± 3.946 meq AG/L) (Tabla 11).

En cuanto a la inhibición del radical DPPH todos los kéfires superaron al control.

El patrón fue diferente para la inhibición del radical ABTS, con el control mostrando valores relativamente altos ($29.586 \pm 2.574\%$).

Tabla 11. Cuadro comparativo de actividad antioxidante en los kéfires de jugos de frutas / verduras, proteínicos de mayor aceptabilidad.

PRUEBA		Polifenoles totales (meq ac gálico/L)	Inhibición del radical DPPH (%)	Inhibición del radical ABTS (%)
KÉFIR DE AGUA CONTROL		8.753±3.946 ^e	54.846±2.443 ^d	29.586±2.574 ^a
SP	KÉFIR DE JUGO DE MANZANA (24 h)	19.48±3.034 ^d	59.302±3.243 ^c	18.056±4.074 ^c
CP		23.087±1.528 ^c	61.770±4.588 ^c	22.058±2.809 ^{b,c}
SP	KÉFIR DE JUGO DE MANGO (24 h)	45.953±8.401 ^b	66.105±1.089 ^b	16.484±3.310 ^c
CP		56.620±5.048 ^a	66.767±2.733 ^b	15.960±2.600 ^c
SP	KÉFIR DE JUGO DE ZANAHORIA (24 h)	29.487±12.05 ^c	60.084±3.986 ^c	27.680±1.733 ^a
CP		30.287±18.61 ^c	59.422±3.029 ^c	26.727±4.165 ^{a,b}
SP	KÉFIR DE JUGO DE NARANJA (24 h)	13.687±6.929 ^{d,e}	80.795±2.835 ^a	19.009±2.518 ^c
CP		15.020±6.245 ^{d,e}	81.156±2.711 ^a	24.202±4.544 ^{a,b,c}

SP: Sin adición de proteína. CP: Con adición de proteína al 2.5%.

Letras diferentes (^{a, b, c, d, e}) dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados demuestran que los kéfires elaborados con jugos de frutas/verduras (incluso de "tercera categoría") presentan ventajas nutricionales y microbianas significativas frente al kéfir de agua tradicional, respaldando su potencial en modelos de economía circular:

El kéfir de mango (CP) mostró el mayor contenido de proteínas (3.035%) y azúcar residual (11.193 g/100 mL), indicando que los azúcares naturales de frutas imperfectas (mango) son sustratos ideales para la fermentación. Esto coincide con Sabokbar et al. (2015), quienes reportaron que kéfires de frutas tropicales aprovechan eficientemente carbohidratos complejos, incluso en frutas descartadas por estándares comerciales.

La reducción de azúcares reductores en kéfires CP sugiere una alta actividad microbiana, similar a lo observado por Fiorda et al. (2017) en kéfires de frutas no comerciales.

El uso de frutas/verduras de "tercera categoría" (mango, manzana, zanahoria) no solo reduce desperdicios, sino que mejora el perfil nutricional del kéfir dando aporte de fibra (Kéfires de manzana y mango superaron al control 1.321–1.329% vs. 0.044%), clave para productos funcionales (Prado et al., 2015).

El alto contenido de cenizas en zanahoria CP (0.670%) refleja retención de minerales, aprovechando vegetales no aptos para mercado fresco (Kwaw et al., 2018).

La adición de proteína (CP) alteró la dinámica microbiana, con diferencias notables entre sustratos. Por ejemplo, el kéfir de manzana CP mostró 7.97×10^5 UFC/mL de BAL (vs. 9.04×10^4 en SP), coincidiendo con Leite et al. (2013), quienes atribuyen este efecto al enriquecimiento con nitrógeno (proteína), que favorece *Lactobacillus* spp. En contraste, mango SP mantuvo altas levaduras (4.38×10^5 UFC/mL), típico de sustratos ricos en fructosa (Gulitz et al., 2011).

La inhibición de radicales libres varió según el sustrato y el método (DPPH vs. ABTS), relacionado con cambios en el consorcio microbiano y composición química.

En el kéfir de mango CP se presentó un contenido de polifenoles (56.620 meq AG/L) pero baja inhibición ABTS (15.960%). Esto podría deberse a la degradación de antocianinas por levaduras durante fermentación (Rodríguez et al., 2018), además de la especificidad del método ABTS, ya que es menos sensible a polifenoles no flavonoides abundantes en mango (Prior et al., 2005).

Alta inhibición DPPH en el kéfir de naranja (81.156%) pero intermedia en ABTS (24.202%). Estudios como Wang et al. (2020) explican que los cítricos contienen flavonoides (ej.: hesperidina) más efectivos contra DPPH.

En general, los kéfires CP mostraron mayor actividad antioxidante (ej.: manzana CP: 61.770% DPPH vs. SP: 59.302%), apoyando que la proteína preserva compuestos bioactivos durante la fermentación (Kwaw et al., 2018).

8.3. Limitaciones

8.3.1. Kéfir con Reducción del volumen de operación

Textura y aceptación: Aunque el 30% de reducción mostró mejores resultados, podría requerir ajustes de viscosidad para mercados acostumbrados a productos más líquidos (Kwaw et al., 2018).

Estabilidad microbiana: Medios concentrados podrían acelerar la acidificación, limitando la vida útil (Gulitz et al., 2011).

8.3.2. Kéfires de Frutas/Verduras

Variabilidad en sustratos: Diferencias en madurez o calidad de frutas descartadas (ej: acidez en naranja: pH 4.063 vs. zanahoria: pH 4.610) afectan la reproducibilidad (Prado et al., 2015).

Regulación: Falta de normativas claras para kéfires no lácteos con residuos agrícolas (Rodríguez et al., 2018).

9. CONCLUSIONES

El presente trabajo tuvo como objetivo general proponer una tecnología sustentable para la elaboración de kéfir de agua "plant based", que pueda incorporarse en una dieta saludable y sostenible. Para ello, se plantearon dos objetivos específicos: optimizar la concentración del consorcio microbiano para obtener un kéfir de agua rico en proteínas, con características sensoriales aceptables y menor huella hídrica, y proponer una tecnología de elaboración a partir de jugos de frutas y verduras de tercera categoría, libre de aditivos y azúcares añadidos.

La hipótesis de trabajo sostenía que es posible obtener un producto de kéfir de agua rico en proteínas mediante un proceso sustentable, con características sensoriales aceptables, aplicando principios de descarbonización y reducción de la huella hídrica. Los resultados obtenidos validan esta hipótesis, demostrando que el kéfir de agua puede ser una alternativa nutricional y ecológicamente viable.

A continuación, se presentan las conclusiones organizadas según los dos enfoques principales del estudio: kéfir de agua con reducción hídrica y kéfir de jugos de frutas y verduras.

Conclusiones sobre kéfir de agua con reducción hídrica

- La bebida con mayor aceptabilidad sensorial fue la elaborada con 30% de reducción del volumen de operación y 48 h de fermentación, utilizando granos de kéfir húmedo en cantidad suficiente para aportar un 2.5% p/V de proteína de buena calidad.
- Se logró obtener un kéfir de agua rico en proteína, con características organolépticas adecuadas y una reducción en el consumo de agua (rvo) del proceso.
- La incorporación del consorcio microbiano molido incrementó notablemente el contenido proteico de las bebidas fermentadas,

superando ampliamente los valores de las bebidas sin este tratamiento (que presentaban menos del 0.5% de proteína).

Conclusiones sobre kéfir de jugos de frutas y verduras

- El proceso de producción de kéfir a partir de jugos de frutas y verduras de tercera categoría demostró ser una alternativa sustentable, ya que aprovecha recursos que, de otro modo, serían desechados.
- Las bebidas de kéfir de jugos de fruta mostraron un mayor contenido de polifenoles y una mayor capacidad antioxidante (DPPH) en comparación con el kéfir de agua comercial.
- La fermentación redujo significativamente la concentración de azúcares reductores en todos los jugos utilizados, disminuyendo el contenido calórico del producto final y alineándose con el desarrollo de bebidas más saludables.

En conjunto, los resultados confirman que es factible producir un kéfir de agua de alta calidad proteica, sensorialmente aceptable y elaborado bajo principios de sostenibilidad, tanto mediante la reducción del volumen de agua de operación como mediante el aprovechamiento de jugos de frutas y verduras de descarte. Este trabajo sienta las bases para futuras investigaciones en el desarrollo de alimentos fermentados nutritivos, saludables y ambientalmente responsables.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdi, A., Gatri, E., Guilbaud, J., Bouallagui, H., Fadhlaoui, K., Garrait, G., & Ayed, L. (2025). Co-cultivation of potential probiotic strains isolated from water kefir for fermented green tea beverage. *Fermentation*, 11(4), 169.
2. Alsayadi, M., Al Jawfi, Y., Belarbi, M., & Sabri, F. Z. (2013). Antioxidant potency of water kefir. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(6), 2444-2447.
3. Alsayadi, M., Al-Jaouni, S., Salam, R., Al-Moghrabi, S., & Al-Ghamdi, A. (2014). Evaluation of Anti-Hyperglycemic and Anti-Hyperlipidemic Activities of Water Kefir as Probiotic on Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. *Journal of Diabetes Mellitus*, 4(2), 85-95.
4. Azi, F., Tu, C., Meng, L., Zhiyu, L., Cherinet, M. T., Ahmadullah, Z., & Dong, M. (2021). Metabolite dynamics and phytochemistry of a soy whey-based beverage bio-transformed by water kefir consortium. *Food Chemistry*, 342, 128225.
5. Bandy, L. K., Scarborough, P., Harrington, R. A., Rayner, M., & Jebb, S. A. (2020). Reductions in sugar sales from soft drinks in the UK from 2015 to 2018. *BMC medicine*, 18(1), 20.
6. Bondue, Pauline, et al. "Effect of Bifidobacterium crudilactis and 3'-sialyllactose on the toddler microbiota using the SHIME® model." *Food Research International* 138 (2020): 109755.
7. Bueno, R. S., Ressutte, J. B., Hata, N. N., Henrique-Bana, F. C., Guergoletto, K. B., de Oliveira, A. G., & Spinosa, W. A. (2021). Quality and shelf life assessment of a new beverage produced from water kefir grains and red pitaya. *Lwt*, 140, 110770.
8. Cai, Y., Sounderrajan, A., & Serventi, L. (2020). Water kefir: A review of its microbiological profile, antioxidant potential and sensory quality. *Acta Scientifci Nutritional Health*, 4(6), 10-17.

9. Çevik, T., AYDOĞDU, N., Özdemir, N., & TAŞ, T. (2019). The effect of different sugars on water kefir grains. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji dergisi*, 7(sp1).
10. Chen, Z., Liu, T., Ye, T., Yang, X., Xue, Y., Shen, Y., ... & Zheng, X. (2021). Effect of lactic acid bacteria and yeasts on the structure and fermentation properties of Tibetan kefir grains. *International Dairy Journal*, 114, 104943.
11. Corona, O., Randazzo, W., Miceli, A., Guarcello, R., Francesca, N., Erten, H., ... & Settanni, L. (2016). Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 572-581.
12. López, P. V., & Corona, C. P. L. (2016). Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial Metabolic responses to stress by yeasts of industrial importance.
13. Cufaoglu, G., & Erdinc, A. N. (2023). An alternative source of probiotics: Water kefir. *Food frontiers*, 4(1), 21-31.
14. 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*, 13(3), 885.
15. DE LUCIO, B. S. V., DOMÍNGUEZ, E. M. H., PÉREZ, L. A. M., & CERVANTES, J. Á. VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: OPORTUNIDADES Y RETOS PARA LOGRAR UNA ECONOMÍA CIRCULAR. *Bioeconomía en Latinoamérica: desafíos para la sostenibilidad y el desarrollo. Volumen 3. Mentefactura bioeconómica*.
16. Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients*, 11(8), 1806.
17. Egea, M. B., Santos, D. C. D., Oliveira Filho, J. G. D., Ores, J. D. C., Takeuchi, K. P., & Lemes, A. C. (2022). A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health

- benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(6), 1536-1552.
18. Eppinga, H., Konstantinov, S. R., Peppelenbosch, M. P., & Thio, H. B. (2014). The microbiome and psoriatic arthritis. *Current rheumatology reports*, 16(3), 407.
 19. Falsoni, R. M. P., Moraes, F. D. S. A., Rezende, M. S. D., Silva, C. L. D., Andrade, T. U. D., Brasil, G. A., & Lima, E. M. D. (2022). Pretreatment with water kefir reduces the development of acidified ethanol-induced gastric ulcers. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, e191046.
 20. Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., de Souza Vandenberghe, L. P., & Soccol, C. R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review. *Food Microbiology*, 66, 86-95.
 21. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2021). Global food losses and waste. [Informe].
 22. Gökırmaklı, Ç., Yüceer, Y. K., & Guzel-Seydim, Z. B. (2023). Chemical, microbial, and volatile changes of water kefir during fermentation with economic substrates. *European Food Research and Technology*, 249(7), 1717-1728.
 23. Gómez, D. (2020). Sostenibilidad. Apuntes sobre sostenibilidad fuerte y débil, capital manufacturado y natural. *Inclusión y Desarrollo*, 8 (1), 131-143.
 24. Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *International journal of food microbiology*, 151(3), 284-288.
 25. Hsieh, H. H., Wang, S. Y., Chen, T. L., Huang, Y. L., & Chen, M. J. (2012). Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International journal of food microbiology*, 157(1), 73-81.
 26. Köhler, S., Schmach, M., Troubounis, A. H., Ludzuweit, M., Rettberg, N., & Senz, M. (2021). Tradition as a stepping stone for a

microbial defined water kefir fermentation process: Insights in cell growth, bioflavoring, and sensory perception. *Frontiers in Microbiology*, 12, 732019.

27. 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.
28. Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2018). Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food microbiology*, 73, 351-361.
29. Laureys, D., & De Vuyst, L. (2017). The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *Journal of applied microbiology*, 122(3), 719-732.
30. Laureys, D., Van Jean, A., Dumont, J., & De Vuyst, L. (2017). Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7), 2811-2819.
31. Lima, A. L. B. D. C., Pinheiro, L. R., Souza, B. J. F. D., & Pereira, A. F. (2024). Different sources of sucrose in water kefir fermentation. *Brazilian Journal of Food Technology*, 27, e2024012.
32. 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.
33. Liu, H., Xu, X., Cui, H., Xu, J., Yuan, Z., Liu, J., ... & Zhu, D. (2023). Plant-based fermented beverages and key emerging processing technologies. *Food Reviews International*, 39(8), 5844-5863.
34. Ma, D., Wang, B., Xiao, S., & Wang, J. (2024). Non-targeted metabolomics unveils metabolic spectrum characteristics and core metabolite interaction networks in water kefir fermentation. *Lwt*, 195, 115840.

35. Magalhães, K. T., Pereira, G. V. D. M., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2011). Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 693-702.
36. Magalhães-Guedes, K. T., Barreto, I. T., Tavares, P. P. L. G., Bezerra, P. Q. M., Silva, M. R., Nunes, I. L., ... & Schwan, R. F. (2020). Effect of kefir biomass on nutritional, microbiological, and sensory properties of mango-based popsicles. *International Food Research Journal*, 27(3), 536-545.
37. Martínez-Torres, M. E., & Rosset, P. M. (2017). Diálogo de saberes in La Vía Campesina: food sovereignty and agroecology. In *Critical perspectives on food sovereignty* (pp. 79-98). Routledge.
38. Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2013). Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS microbiology letters*, 348(1), 79-85.
39. Moretti, A. F., Moure, M. C., Quiñoy, F., Esposito, F., Simonelli, N., Medrano, M., & León-Peláez, Á. (2022). Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods*, 5, 100123.
40. Ouyang, W., Liao, Z., Yang, X., Zhang, X., Zhu, X., Zhong, Q., ... & Wang, J. (2024). Microbial composition of water kefir grains and their application for the detoxification of aflatoxin B1. *Toxins*, 16(2), 107.
41. Patel, S. H., Tan, J. P., Börner, R. A., Zhang, S. J., Priour, S., Lima, A., ... & Duboux, S. J. I. F. S. (2022). A temporal view of the water kefir microbiota and flavour attributes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 80, 103084.
42. 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

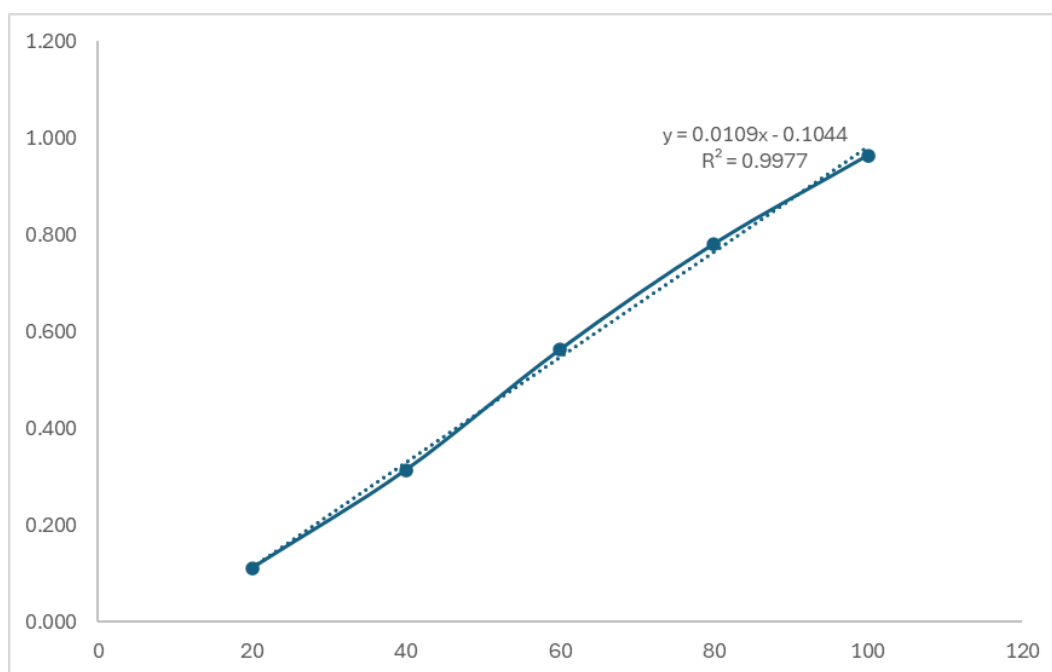
- fermented beverage. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 162-180.
43. Pidoux, M. (1989). The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing.
 44. Rocha-Gomes, A., Escobar, A., Soares, J. S., Silva, A. A. D., Dessimoni-Pinto, N. A. V., & Riul, T. R. (2018). Chemical composition and hypocholesterolemic effect of milk kefir and water kefir in Wistar rats. *Revista de Nutrição*, 31(2), 137-145.
 45. Rodrigues, K. L., Araújo, T. H., Schneedorf, J. M., de Souza Ferreira, C., Moraes, G. D. O. I., Coimbra, R. S., & Rodrigues, M. R. (2016). A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. *Journal of Functional Foods*, 21, 58-69.
 46. Romero-Luna, H. E., Peredo-Lovillo, A., Hernández-Mendoza, A., Hernández-Sánchez, H., Cauich-Sánchez, P. I., Ribas-Aparicio, R. M., & Dávila-Ortiz, G. (2020). Probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* CT12 isolated from water kefir grains (Tibicos). *Current Microbiology*, 77(10), 2584-2592.
 47. Searchinger, T., Waite, R., Hanson, C., Ranganathan, J., Dumas, P., & Matthews, E. (2018). Creating a sustainable food future: a menu of solutions to feed nearly 10 billion people by 2050-synthesis report.
 48. Secretaría de Salud (SSA), Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), & FAO. (2023). Guías Alimentarias. Estableciendo las bases para una alimentación saludable para la población mexicana. Documento de Postura. Instituto Nacional de Salud Pública.
 49. Shahabi-Ghahfarrokhi, I., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Yousefi, H. (2015). Effect of γ -irradiation on the physical and mechanical properties of kefir biopolymer film. *International journal of biological macromolecules*, 74, 343-350.

50. Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T., & Goksungur, Y. (2014). Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydrate Polymers*, 99, 454-461.
51. Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food microbiology*, 35(2), 92-98.
52. Swinburn, B. A., Kraak, V. I., Allender, S., Atkins, V. J., Baker, P. I., Bogard, J. R., ... & Dietz, W. H. (2019). The global syndemic of obesity, undernutrition, and climate change: the Lancet Commission report. *The lancet*, 393(10173), 791-846.
53. Talib, N., Mohamad, N.E., Ho, C.L. *et al.* Modulatory Effects of Isolated *Lactobacillus paracasei* from Malaysian Water Kefir Grains on the Intestinal Barrier and Gut Microbiota in Diabetic Mice. *Probiotics & Antimicro. Prot.* (2024).
54. Torino, M. I., Font de Valdez, G., & Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in microbiology*, 6, 834.
55. 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, 479.
56. Waldherr, F. W., Doll, V. M., Meißner, D., & Vogel, R. F. (2010). Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiology*, 27(5), 672-678.
57. Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., ... & Murray, C. J. (2019). Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The lancet*, 393(10170), 447-492.
58. World Health Organization (WHO). (2023). Noncommunicable diseases: Key facts.

ANEXOS

Anexo I Curva patrón de glucosa para cuantificación de azúcares totales

glucosa mg/L	absorbancia
20	0.112
40	0.315
60	0.563
80	0.782
100	0.965

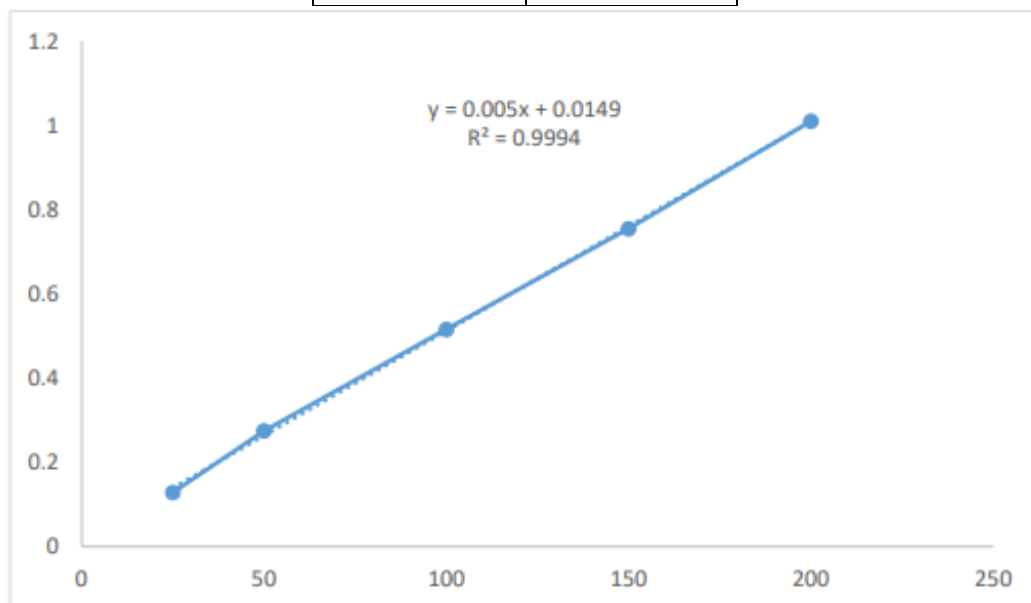


Anexo II Curva patrón para cuantificación de polifenoles totales

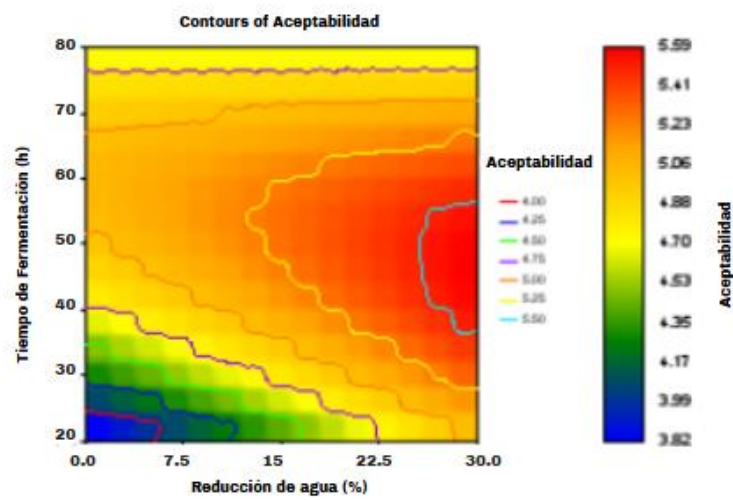
Muestra		Blanco
Muestra	250 μ L	-
Agua destilada	4.4 mL	4.650 mL
Reactivo Follin	100 μ L	100 μ L
Na ₂ CO ₃ concentrado	250 μ L	250 μ L

mg equivalentes de ácido gálico/L vs absorbancia

a. gálico (mg/L)	absorbancia
25	0.128666667
50	0.275
100	0.516
150	0.755
200	1.01



Anexo III Gráfica de contorno para la aceptabilidad del kéfir reducido en agua





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00329

Matrícula: 2233803893

Producción sustentable de
kéfir de agua.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 13 del mes de noviembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA
DRA. LILIA SANCHEZ MINUTTI
DR. ALEJANDRO TELLEZ JURADO
DR. GERARDO DIAZ GODINEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: ADRIANA JUAREZ RAMIREZ



ADRIANA JUAREZ RAMIREZ
ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLÍVARES

PRESIDENTA

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

VOCAL

DRA. LILIA SANCHEZ MINUTTI

VOCAL

DR. ALEJANDRO TELLEZ JURADO

SECRETARIO

DR. GERARDO DIAZ GODINEZ