



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS**

# **CARACTERIZACIÓN DE UNA BEBIDA Y BIOMASA PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL MEDIANTE FERMENTACIÓN SUMERGIDA CON MICROORGANISMOS TIBETANOS**

Trabajo de titulación para optar el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTOR: CÉSAR ANDRÉS PAUCAR BARRENO**

**TUTOR: ING. BYRON LEONCIO DÍAZ MONROY, PhD**

Riobamba – Ecuador

2016

© 2016, Paucar Barreno César Andrés

Se autoriza la reproducción parcial o total, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS**

El tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación “CARACTERIZACIÓN DE UNA BEBIDA NUTRITIVA Y BIOMASA PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL MEDIANTE FERMENTACIÓN SUMERGIDA CON MICROORGANISMOS TIBETANOS”, de responsabilidad del señor Paucar Barreno César Andrés ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

ING. BYRON DÍAZ MONROY, PHD

**DIRECTOR DE TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

DRA. YOLANDA DÍAZ, M.SC.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

## **DECLARACION DE AUTENTICIDAD**

Yo, César Andrés Paucar Barreno, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos que constan en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académicas de los contenidos de este trabajo de titulación.

---

César Andrés Paucar Barreno

060444893-6

Yo, César Andrés Paucar Barreno soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

CÉSAR ANDRÉS PAUCAR BARRENO

## **DEDICATORIA**

Dedico mi tesis a Dios con gratitud ya que es el único que me brinda la fuerza, valor y virtud indispensables para vencer toda dificultad. A mis padres, César Adalberto Paucar Limaico y Judith Marlene Barreno Rea, a quienes reconozco la sacrificada labor para educarme siendo mi fuente de inspiración para alcanzar mis objetivos. Gracias por brindarme siempre su amor sincero e incondicional. A mi novia María Isabel Zamora por darme apoyo incondicional en todo momento en el transcurso de mi carrera. A mi familia, amigos y catedráticos que contribuyeron a lo largo de esta etapa con sus enseñanzas, ejemplos y consejos que me permitieron con esfuerzo y sacrificio alcanzar esta meta profesional.

Cesar Andrés Paucar Barreno.

## **AGRADECIMIENTO**

A la “Escuela Superior Politécnica de Chimborazo” por haberme formado y abierto las puertas para estudiar esta carrera.

Mi agradecimiento al Dr. Byron Díaz, Dra. Yolanda Díaz, Ing. Rene Carvajal y

Dr. Carlos Pilamunga por su valiosa colaboración y demás profesionales quienes me han ofrecido su amistad sincera a la vez que ayudaron para la realización de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>Identificación del problema</b> .....	1
<b>Justificación del proyecto</b> .....	1
<b>Objetivos</b> .....	2
<i>Objetivo general</i> .....	2
<i>Objetivos específicos</i> .....	2
<b>CAPITULO I</b> .....	3
<b>1. MARCO REFERENCIAL</b> .....	3
<b>1.1 Antecedentes de la investigación</b> .....	3
<i>1.1.1 Alimentos Funcionales</i> .....	3
<i>1.1.2 Probióticos</i> .....	3
<i>1.1.3 Simbiosis</i> .....	4
<i>1.1.4 Fermentación Sumergida</i> .....	4
<i>1.1.5 Microorganismos Tibetanos</i> .....	5
<i>1.1.6 Beneficios del kefir de agua</i> .....	15
<i>1.1.7 Sustrato para la producción del kéfir de agua</i> .....	16
<b>1.2 Marco conceptual</b> .....	17
<b>CAPITULO II</b> .....	20
<b>2. MARCO METODOLÓGICO</b> .....	20

2.1	<b>Hipótesis y especificaciones de las variables</b> .....	20
2.1.1	<i>Descripción de hipótesis y variables</i> .....	20
2.2	<b>Tipo y diseño de investigación</b> .....	20
2.3	<b>Unidad de análisis</b> .....	21
2.4	<b>Población de estudio</b> .....	21
2.5	<b>Tamaño de muestra</b> .....	21
2.6	<b>Selección de muestra</b> .....	21
2.7	<b>Técnicas de recolección de datos</b> .....	21
2.7.1	<i>Ubicación del proyecto</i> .....	21
2.7.2	<i>Materiales y equipos</i> .....	22
2.7.3	<i>Tratamientos y diseño experimental</i> .....	24
2.7.4	<i>Mediciones experimentales</i> .....	25
2.7.5	<i>Análisis estadístico</i> .....	26
2.7.6	<i>Procedimiento experimental</i> .....	26
2.7.7	<i>Metodología de Evaluación</i> .....	28
<b>CAPITULO III</b> .....		43
3.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	43
3.1	<b>Identificación del sustrato azucarado más adecuado para la elaboración de la bebida y producción de biomasa con microorganismos tibetanos.</b> .....	43
3.1.1	<i>Análisis de la vida de anaquel de la bebida nutritiva elaborada con microorganismos tibetanos.</i> .....	44

<b>3.2 CARACTERIZACIÓN DE UNA BEBIDA Y BIOMASA PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL MEDIANTE FERMENTACIÓN SUMERGIDA CON MICROORGANISMOS TIBETANOS.....</b>	<b>45</b>
3.2.1 <i>Evaluación física:</i> .....	45
3.2.2 <i>Evaluación bromatológica:</i> .....	47
3.2.3 <i>Evaluación microbiológica:</i> .....	51
3.2.4 <i>Evaluación bioquímica:</i> .....	56
3.2.5 <i>Evaluación organoléptica:</i> .....	62
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1.</b> Gránulos de kefir de agua.....	5
<b>Figura 2-1.</b> Estructuras del kéfir de agua. Por metilación la estructura kefirosa, en cambio el análisis con peryodato-oxidación presenta la estructura Kefiran. ....	9
<b>Figura 3-1.</b> Lactobacillus hilgardii. La producción extracelular de sustancias poliméricas dada por Lactobacillus hilgardii muestra el polisacárido confirmado por microscopía electrónica (A) y (B). ....	10

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3.</b> Evaluación de la cantidad de biomasa producida al finalizar la fermentación sumergida. ....	46
<b>Gráfico 2-3.</b> Evaluación de proteína resultante en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida. ....	47
<b>Gráfico 3-3.</b> Evaluación de calcio resultante en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida. ....	48
<b>Gráfico 4-3.</b> Evaluación de hierro resultante en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida. ....	50
<b>Gráfico 5-3.</b> Evaluación de BAL presentes en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida. ...	52
<b>Gráfico 6-3.</b> Evaluación de levaduras presentes en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida. ....	55
<b>Gráfico 7-3.</b> Evaluación de acidez total presente en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida. ....	57
<b>Gráfico 8-3.</b> Evaluación de grados brix presentes en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida. ....	59
<b>Gráfico 9-3.</b> Evaluación de grados azúcares reductores presentes en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.....	60
<b>Gráfico 10-3.</b> Evaluación de grados ácido láctico presente en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.....	61
<b>Gráfico 11-3.</b> Evaluación del color en las bebidas según el análisis afectivo. ....	63
<b>Gráfico 12-3.</b> Evaluación del sabor en las bebidas según el análisis afectivo. ....	64
<b>Gráfico 13-3.</b> Evaluación del olor en las bebidas según en análisis afectivo.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1.</b> Bacterias Y Levaduras Que Se Encuentran En Los Gránulos De Kéfir De Agua. ....	7
<b>Tabla 2-1.</b> Cepas Microbianas Encontradas En Los Gránulos De Kéfir De Agua.....	8
<b>Tabla 3-1.</b> Especie homo y heterofermentativas en el kéfir de agua. ....	11
<b>Tabla 4-1.</b> Composición Nutricional De La Panela.....	17
<b>Tabla 1-2.</b> Condiciones Meteorológicas - Espoch.....	22
<b>Tabla 2-2.</b> Composición De La Bebida Y Microorganismos Utilizados En La Fermentación Sumergida.....	25
<b>Tabla 3-2.</b> Esquema Del Experimento. ....	25
<b>Tabla 4-2.</b> Composición De La Bebida Y Biomasa Aplicando Diferentes Sustratos Azucarados.....	27
<b>Tabla 1-3.</b> Cantidad De Biomasa Producida En Función Del Sustrato Utilizado. ....	43
<b>Tabla 2-3.</b> Evaluación De Vida De Anaquel Para Ver El Tiempo De Conservación De La Bebida Pasteurizado Y Sin Pasteurizar. ....	44
<b>Tabla 3-3.</b> Resultados De La Tinción Gram.....	53

## **RESUMEN**

El objetivo de esta investigación fue producir y caracterizar una bebida nutritiva para humanos y biomasa para alimento animal que se genera a partir de la fermentación sumergida con microorganismos tibetanos. Se realizaron análisis físicos, bromatológicos, microbiológicos, bioquímicos y organolépticos para revelar sus propiedades nutricionales y su potencial probiótico; siguiendo técnicas apropiadas de campo. Con ello se identificó el grupo de cepas microbianas que comprenden bacterias ácido lácticas (BAL) con un valor de  $5.8 \times 10^6$  UFC/ml y levaduras con un valor de  $2.5 \times 10^5$  UPC/ml que actúan en el proceso de fermentación. Los resultados obtenidos demostraron una cantidad aceptable de ácido láctico de 0.66 mg/l que no sobrepasó los límites permitidos por lo que puede ser utilizada en deportistas cuando están bajo esfuerzo físico prolongado. Con este estudio se determinó las diferencias entre cinco tratamientos aplicados con distintos niveles de sustrato en un tiempo de fermentación de 72 horas. Se concluyó de acuerdo a los resultados obtenidos conforme el análisis estadístico que el tratamiento 5 reveló las mejores características en ámbito nutricional ya que influye directamente la cantidad de sustrato que se utilizó en laboratorio; también de acuerdo a la aceptación de un tribunal de degustación los tratamientos 3, 4 y 5 presentaron características organolépticas muy aceptables. Fue muy importante demostrar con esta caracterización la ausencia de agentes patógenos debido a la presencia de ácido láctico y microorganismos benéficos que no permiten su proliferación y reproducción; con ello se afirmó que la bebida es un producto seguro para el consumo humano y la biomasa como suplemento alimenticio para animales. Su producción implica costos relativamente bajos aportando múltiples beneficios a la salud siendo una bebida segura para su consumo. Se recomienda el consumo de esta bebida que contiene BAL y ácido láctico como alternativa para personas intolerantes a los lácteos y sus derivados.

**PALABRAS CLAVE:** <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <BIOTECNOLOGÍA>, <FERMENTACIÓN>, <BIOMASA>, <PROBIÓTICO>, <ÁCIDO LÁCTICO>, <NUTRICIONAL>.

## **ABSTRACT**

The objective of this research was to produce and characterize a nutritious beverage for humans, and biomass for animal feed generated from the submerged fermentation with tibetan microorganisms. Physical, bromatological, microbiological, biochemical and organoleptic analyzes were performed to reveal their nutritional properties and their probiotic potential, following appropriate field techniques. With this study, we identified the group of microbial strains comprising of lactic acid bacteria (LAB) with a value of  $5.8 \times 10^6$  CFU/ml and yeast with a value of  $2.5 \times 10^5$  CPU/ml which act on the fermentation process. The results obtained demonstrated an acceptable amount of lactic acid of 0.66 mg/l that did not exceed the acceptable limits, reason why it can be used for athletes when they are under prolonged physical exertion. This study determined the differences between five treatments applied with different levels of substrate in a fermentation time of 72 hours. It was concluded according to the results obtained and consistent with the statistical analysis that treatments 5 revealed the best characteristics in the nutritional field since it directly influences the amount of substrate that was used in the laboratory; also according to the acceptance of a taste test, treatments 3, 4 and 5 presented very acceptable organoleptic characteristics. It was very important to demonstrate with this characterization the absence of pathogens due to the presence of lactic acid and beneficial microorganisms that do not allow their proliferation and reproduction. With these findings it was affirmed that the drink is a safe product for human consumption and the biomass as a feeding supplement for animals. Its production implies relatively low costs providing multiple health benefits being a safe drink for consumption. The consumption of this beverage containing LAB and lactic acid is recommended as an alternative for people with intolerance to lactose products and their derivatives.

**KEYWORDS:** <ENGINEERING TECHNOLOGY AND SCIENCES>, <BIOTECHNOLOGY>, <FERMENTATION>, <BIOMASS>, <PROBIOTIC>, <LACTIC ACID>, <NUTRITIONAL>.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Identificación del problema**

Tomando en cuenta el incremento de la población mundial que se desarrolla en proporciones descontroladas hay nuevos retos con la producción y distribución de alimentos, se debe considerar el uso de recursos para cubrir las demandas de producción de alimentos. Conforme con las proyecciones recientes, la población mundial alcanzará próximamente los 9000 millones de habitantes para el año 2050. Los países en desarrollo cuentan con estructuras de población muy jóvenes y la salida del campo a la ciudad se torna más pronunciada en todo el mundo ya que habrá más habitantes en el área urbana que la rural, esto provoca fuertes efectos para la agricultura y el transporte junto con la fabricación de productos alimenticios provocando un gran requerimiento en el mercado global ya que se convierten en una prioridad esencial como componentes en la seguridad alimentaria. (FAO, 2001)

Una alternativa para alimentación, son los alimentos funcionales como una potencial elección a los cuales se les puede adicionar o cambiar un factor, alimentos que se les cambia la naturaleza de uno o varios factores y que la biodisponibilidad de uno o más de sus factores ha sido cambiada. Los consumidores europeos y estadounidenses que ingieren este tipo de alimentos piensan que esta comida puede reemplazar a los medicamentos y el 70% de las personas conocen ciertos componentes de los alimentos que podrían prevenir el cáncer; y así se podría decir que son “Alimentos que proporcionan determinados efectos fisiológicos beneficiosos nutritivos que pueden ayudar a la salud de los consumidores”, ya que están destinados a toda la gente que desea mejorar y mantener sus condiciones de salud. (Roman et al., 2003)

Se puede aplicar la biotecnología tradicional en la obtención de nuevos alimentos que incluye procesos de fermentación y la combinación de ciertas técnicas de selección artificial, cruzamientos selectivos (hibridación) y la mutagénesis y también formación de nuevos probióticos que aportan beneficios a la salud que influyen en procesos productivos, y transformación genética de especies que se utilizan en la industria alimenticia en beneficio de la humanidad. (Argen - Bio, 2007)

### **Justificación del proyecto**

Son marcados los problemas que tenemos en la actualidad con la demanda de alimentos y seguridad alimentaria en el mundo; con esto genera escases de comida y así existe la necesidad

de producir varias alternativas de fácil abastecimiento y acceso. Se necesita cambiar el enfoque productivo y aprovechar nuevas alternativas alimenticias que no han sido utilizadas con ayuda de la biotecnología, así también dar a la sociedad productos de calidad, seguros, baratos e inocuos para lograr un óptimo desempeño en las regiones que más lo requieren.

También está enfocado en el aprovechamiento de recursos que pueden ser potencialmente utilizados como alimentos para la producción animal como nuevos sustitutos que ayuden a su dieta proporcionando las ventajas nutricionales.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Producir y caracterizar biomasa para alimento animal junto con una bebida nutritiva para deportistas que se genera a partir de la fermentación sumergida con microorganismos tibetanos.

### ***Objetivos específicos***

- Caracterizar el proceso de fermentación sumergida utilizando microorganismos tibetanos.
- Identificar las cepas de microorganismos participantes en este proceso de fermentación.
- Producir una bebida hidratante nutritiva para deportistas en base a fermentación sumergida con microorganismos tibetanos y sustratos azucarados.
- Determinar los costos y beneficios de producir la biomasa para alimentación animal.

## **CAPITULO I**

### **1. MARCO REFERENCIAL**

#### **1.1 Antecedentes de la investigación**

##### *1.1.1 Alimentos Funcionales*

Los alimentos funcionales se encuentran en sustancias con distintas funciones biológicas, llamadas componentes bioactivos, capaces de modular la fisiología del organismo y asegurar el mantenimiento de la salud humana. (Bergmann et al., 2009: pp.1022-1026)

El concepto de alimentos funcionales nació en Japón, a finales de la década de los años 80 y así se extendió mundialmente por sus beneficios en la salud humana. Desde los años 90, las autoridades de Japón, Estados Unidos de América y de la Unión Europea han dispuesto políticas que permitan normar los alimentos funcionales, las cuales tienen algunos cambios conforme el país. (Walter P, 2013)

Según (BBC, 2014), el mercado de los alimentos funcionales, en particular para los probióticos, ha ido creciendo durante los últimos años y se espera que esta tendencia continúe durante los próximos años.

##### *1.1.2 Probióticos*

El término probiótico significa “a favor de la vida” (FAO - OMS, 2006); se definen los probióticos como “microorganismos vivos que contribuyen a la salud y bienestar del huésped manteniendo o mejorando su balance intestinal microbiano” (Sabir F et al., 2010). Para que una cierta cepa mantenga y actúe con su potencial probiótico en una persona, debe tener la habilidad de resistir un pH extremadamente bajo y un efecto detergente de las sales biliares, además de tener la capacidad para adherirse y colonizar la mucosa intestinal. (Sabir F et al., 2010)

Según (Sabir F et al., 2010), se han realizado estudios sobre las propiedades que ofrecen los probióticos para reducir el riesgo y prevenir o tratar enfermedades intestinales; en investigaciones realizadas se determinan el efecto probiótico de las bacterias *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., y *Pediococcus* spp. encontradas en el kéfir de leche, se determinó que estas bacterias tienen la capacidad de sobrevivir a bajos niveles de pH, a las sales biliares y que son capaces de

autoagregarse (capacidad de adherirse a las células epiteliales del intestino) y coagregarse con *E. coli*. La coagregación presenta una barrera que previene la colonización de microorganismos patógenos. Dados los resultados estos géneros bacterianos pueden ser considerados probióticos potenciales.

Según la (FAO - OMS, 2006), los microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y el número de alimentos probióticos puestos a disposición de los consumidores es cada vez mayor. Las bacterias viven normalmente en el cuerpo humano (así como en el de los animales superiores y los insectos), incluido el aparato digestivo, donde existen más de 400 especies bacterianas. (Tannock, 1999: pp.67-77)

### *1.1.3 Simbiosis*

Según (Görtz, 1988), la simbiosis se define en primer lugar en 1879 por el micólogo alemán Heinrich Anton de Bary, quien lo definió como "la convivencia de diferencia de los organismos.

En general, incluye el mutualismo, comensalismo y parasitismo. Los organismos viven en el mutualismo cuando ambas partes se benefician mutuamente. La asociación de organismos en comensalismo se benefician el uno del otro, pero también son capaces de vivir por sí solos que también es llamado proto-cooperación, mientras que el parasitismo es donde los organismos participantes no son capaces de sobrevivir en un mismo cultivo (Fredrickson, 1977: pp.63-88).

Según (Frey-Klett et al., 2011: pp.583-609), las interacciones entre distintos organismos pueden surgir en diferentes formas espaciales, (detección de quórum) o muy asociadas simbióticas con factores de adhesión, como las proteínas o polisacáridos (biofilm). Estas asociaciones pueden apoyarse en diferentes interacciones moleculares, como el ajuste del entorno físico-químico (cambio de pH), interacciones tróficas (organismos se benefician de los agentes metabólicos de la otra), cambio de metabolito de diferentes organismos resultantes en moléculas que ninguno de los dos puede producir por sí solo (metabolismo cooperativa), secreción de proteínas y transferencia de genes.

### *1.1.4 Fermentación Sumergida*

La fermentación sumergida en cultivo fue descrita por EBNER (1993 y 1999); en este tipo de cultivos sumergidos los nutrientes se encuentran en forma líquida y los microorganismos se

desarrollan flotando libremente en suspensión en el volumen de medio de cultivo o formando agregados más o menos esféricos (pellets) en el caso de los cultivos de hongos.

### ***1.1.5 Microorganismos Tibetanos***

#### ***1.1.5.1 Origen***

El origen del kéfir de agua es desconocido. Una leyenda de los hongos tibetanos relata que a inicios del siglo XII en Asia central, algunos monjes tibetanos salieron a recoger frutos para alimentarse y observaron a un oso que padecía y con el uso de sus últimas fuerzas se frotaba contra un árbol que estaba cubierto con una sustancia blanca mucosa; luego de algunos días notaron sorprendidos al animal que paseaba completamente sano y a la brevedad analizaron el árbol y descubrieron estos hongos blancos. Los monjes los conservaron y probaron las propiedades curativas que daban al ingerir y generaron un método para conservarlos. (Disegni, 2012)



**Figura 1-1.** Gránulos de kefir de agua.

**Fuente:** (Stadie, 2013)

La primera descripción de los granos parecidos denominada "Planta de jengibre cerveza" fue traída por soldados ingleses desde Crimean en 1855. Otras referencias hacen a unos granos (llamado Tibi) cactáceas mexicana del género "Opuntia" donde fueron tomadas las hojas. (Gulitz et al., 2011: pp.284-288) (Stadie, 2013). Hay muchos sinónimos que se pueden encontrar en la actualidad por lo que esta simbiosis también se encuentra como: "Tibicos (Tibi)", "Abejas de California", "Abejas Africanas", "Nueces Ale", "Bálsamo de Galaad", "Semillas de cerveza"

japonesas", "Granos de kéfir azucaradas", "Búlgaros", "Cristales de Agua japoneses", "Graines Vivantes (francés)", "Wasserkefir", "Piltz, (alemán)", "Kéfir di Frutta (italiano)", "Kefirs / Keefir / Kéfir", "Aguamarina Gemas", "Sea Arroz", "Sugary Hongo, Graines Vivantes", "Kefir d'acqua / aqua", "Kefir d'uva (se utiliza el jugo de uva)", "bebees", "Abejas australianas", "Abejas jengibre", "Abejas vinagre", "Planta de Cerveza". (Yemoos Nutritiva Culturas, 2015). Se produce en grandes cantidades, sobre todo en Rusia, es utilizado en Suecia, Noruega, Finlandia, Hungría, Polonia, Alemania, Grecia, Austria, Brasil, Argentina, Taiwán, Portugal, Turquía, Francia e Irán, Estados Unidos, y Japón. (Alsayadi et al., 2013: pp.2444-2447)

#### *1.1.5.2 Definición*

El kéfir de agua o llamados hongos tibetanos es un conjunto microbiano multiespecífico que se encuentra estable con distintos microorganismos y se emplea para elaborar una bebida fermentada a base de sacarosa y agua. (Davidovičl et al., 2014: pp.594-604) (Waldherr et al., 2010: pp.672-678) La bebida se considera como un probiótico y se compone de granos y un sobrenadante en el cual está contenido un grupo de microorganismos, polisacáridos, aminoácidos, vitaminas, ácidos, etanol y sustancias volátiles. El líquido que resulta del proceso es efervescente y nublado, con gas, de baja acidez, algo dulce y levemente alcohólica, dependiendo de acuerdo al tiempo de fermentación. Se determinaron las especies microbianas que se encuentran en los granos como consorcio estable y simbiótico de varios lactobacilos, bacterias del ácido acético y levaduras. (Bergmann et al., 2010: pp.1022-1026) (Monar et al., 2014)

#### *1.1.5.3 Composición física*

Los tibicos son gránulos similares a una coliflor, con un diámetro promedio de 5 a 20 mm, con una apariencia transparente y estructura elástica, los microorganismos se encuentran adheridos en los gránulos, en forma de hielo triturado. (Bergmann et al., 2009: pp. 1022-1026) (Monar et al, 2014)

#### *1.1.5.4 Composición química*

Producen los tibicos diversos líquidos azucarados, alimentándose de los azúcares para producir ácido láctico, etanol y dióxido de carbono que hace que la bebida quede carbonatada. Estos microorganismos generan un tipo de fermentación hidroalcohólica en agua y en leche. (Bergmann et al., 2010: pp.1022-1026) (Waldherr et al., 2010: pp.672-678)

### 1.1.5.5 Composición microbiológica

Se han realizado diversos estudios del kéfir de agua referente a su composición microbiológica para saber que bacterias y levaduras se encuentran dentro del consorcio microbiano presente. Según (Teixeira et al., 2011: pp. 693-702) al aislar un total de 289 bacterias y 129 levaduras, durante el proceso fermentativo, el 57.65% fueron bacterias ácido lácticas, seguidas de levaduras que representaban el 30.86% y finalmente las bacterias acéticas con el 11.48%. Mediante Microscopía electrónica de barrido se mostró que la microbiota presente predominan los bacilos células (cortas y curvas de largo) que crecen en estrecha asociación con las células de levaduras en forma de limón. (Teixeira et al., 2011: pp.693-702) Se detalla en la Tabla 1-2 y 2-2, los microorganismos presentes en los gránulos de kéfir.

**Tabla 1-1.** Bacterias y levaduras que se encuentran en los gránulos de kéfir de agua.

<b>BACTERIAS</b>	<b>%</b>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	23,8
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	16,61
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	11,76
<i>Lactobacillus kefir</i>	10,03
<i>Lactococcus lactis</i>	10,03
<i>Lactobacillus casei</i>	8,6
<i>Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei</i>	7,96
<i>Leuconostoc citreum</i>	5,54
<i>Lactobacillus paracasei subsp. Tolerans</i>	3,11
<i>Lactobacillus buchneri</i>	2,42
<b>LEVADURAS</b>	<b>%</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54,26
<i>Kluyveromyces lactis</i>	20,15
<i>Lachancea meyersii</i>	10,85
<i>Kazachstania aerobia</i>	14,73

**Fuente:** (Teixeira et al., 2011: pp. 693-702)

**Tabla 2-1.** Cepas microbianas encontradas en los gránulos de kéfir de agua.

<b>BACTERIAS</b>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus lactis cremoris</i>	<i>Lactobacillus casei subsp. Casei</i>
<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Lactobacillus casei subsp. Pseudopantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus fructiovorans</i>
<i>Lactobacillus keranofaciens</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. Dextranicum</i>	<i>Enterobacter hormachei</i>
<i>Gluconobacter frateur</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>
<b>BIFIDOBACTERIA</b>	<i>B. psychraerophilum</i>
<b>LEVADURAS</b>	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces florentinus</i>	<i>Saccharomyces pretoriensis</i>
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Hanseniaspora viniae</i>	<i>Hanseniaspora yalbensis</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Candida colliculosa</i>	<i>Toruspola delbruechii</i>
<i>Candida inconspicua</i>	<i>Candida magnoliae</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Kluyveromices lactis</i>	<i>Kluyveromices marxianus</i>

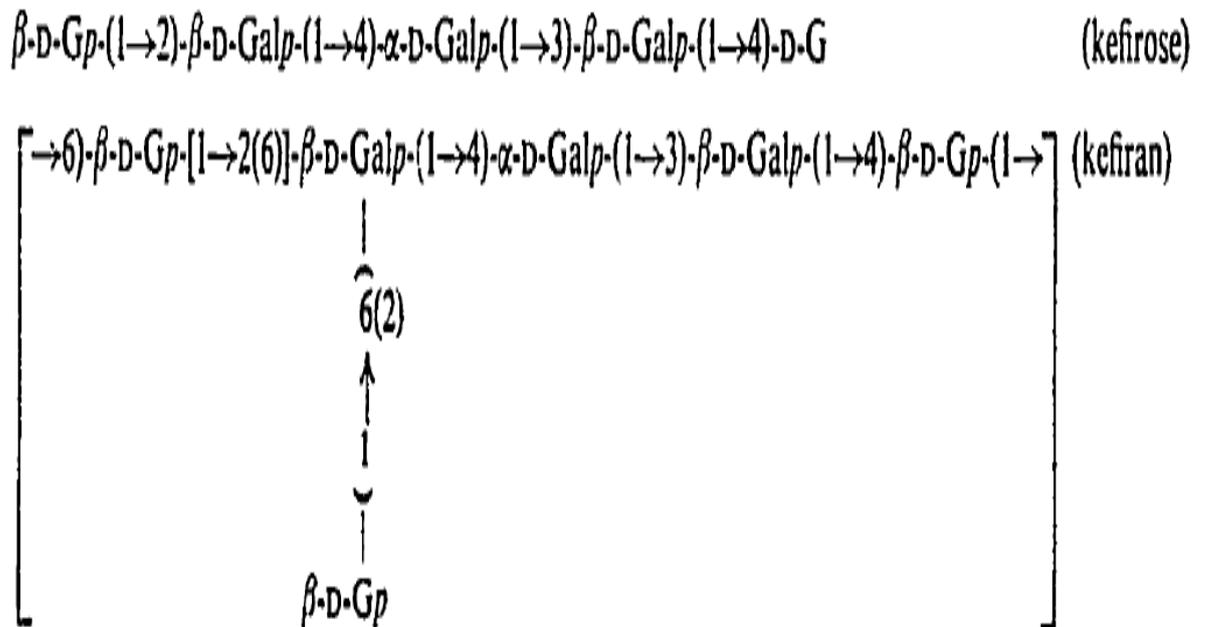
**Fuente:** (Bergmann et al., 2010: pp.1022-1026) (Waldherr et al., 2010: pp.672-678) (Schneedorf, 2012)

#### 1.1.5.6 Composición bioquímica

Los gránulos se conforman de alrededor de 890 a 900 g/kg de agua, 2 g/kg de lípidos, 30 g/kg de proteínas, 60 g/kg de azúcares, y 7 g/kg de cenizas. (Bergmann et al., 2009: pp.1022-1026). Están conformados por un conjunto de polisacáridos, básicamente por dextranos no solubles en agua, dispuestos en dos capas. La externa es compacta y en ella se encuentran todo el conjunto de microorganismos que conforman bacterias y levaduras, mientras que la interna se compone de una estructura esponjosa debido a la acumulación de CO<sub>2</sub> que se produce durante la fermentación. (Moreno, 2005)

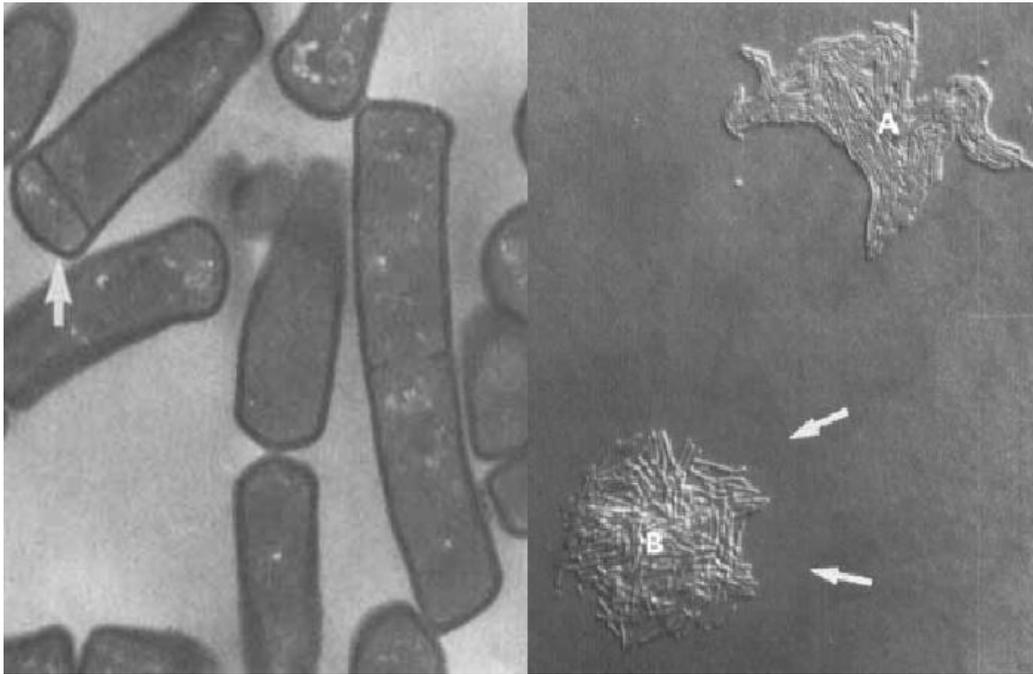
El dextrano de los gránulos de Kéfir de agua al ser insoluble; es un polisacárido que consiste principalmente de (1 - 6) - $\alpha$ -D-glucano. (Kooiman, 1967: pp.200-211) (Pidoux, 1990: pp.223-238). Se ha identificó al *Lactobacillus hilgardii* como la principal bacteria encargada de la

producción del polímero, por medio de la enzima glicosiltransferasa. (Davidović et al., 2014: pp.594-604) (Monar et al, 2014) (Laureys, 2014: pp.2564-2572) (Waldherr, 2010: pp.672-678) (Pidoux, 1989: pp.223-238)



**Figura 2-1. Estructuras del kéfir de agua.** Por metilación la estructura kefirosa, en cambio el análisis con peryodato-oxidación presenta la estructura Kefiran.

**Fuente:** (Kooiman, 1967: pp.200-211)



**Figura 3-1. *Lactobacillus hilgardii*.** La producción extracelular de sustancias poliméricas dada por *Lactobacillus hilgardii* muestra el polisacárido confirmado por microscopía electrónica (A) y (B).

Fuente: (Pidoux et al., 1990: pp.223-238)

#### 1.1.5.7 *Metabolismo*

##### 1.1.5.7.1 *Bacterias ácido lácticas (BAL)*

Son bacterias Gram-positivas, que usan azúcares (hidratos de carbono) como fuente de energía y producen ácido láctico. (Ramírez et al., 2011: pp.56-71) Los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* pertenecen al grupo de bacterias del ácido láctico. En el kéfir agua se encuentran varias especies de los dos géneros primero se podían encontrar BAL homofermentativa y heterofermentativa. (Gulitz et al., 2013: pp.1082-1091)

- BAL Homofermentativas glucosa catabolizar LAB través de la vía Emden-Meyerhof con lactato como su principal producto final. Debido a la falta de aldolasa y triosa fosfato isomerasa de glucosa. (Stadie, 2013)
- BAL heterofermentativo metabolizar por la producción de cantidades equimolares de lactato, etanol y dióxido de carbono a través de la vía de las pentosas fosfato. (Stadie, 2013)

Durante estas reacciones sólo un mol de ATP da como resultado de un mol de glucosa mientras que al producir fermentación homoláctica da 2 ATP mol, bajo condiciones de fermentación heteroláctica glucosa también se traduce en 2 ATP mol. (Stadie, 2013)

**Tabla 3-1.** Especie homo y heterofermentativas en el kéfir de agua.

<b>homofermentativas BAL en el kefir de agua</b>	<b>heterofermentativas BAL en el kefir de agua</b>
<i>Lactobacillus Hordei</i>	<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus Nagelii</i>	<i>Leuconostoc Citreum</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus Hilgardii</i>

**Fuente:** (Gulitz et al., 2013: pp.1082-1091)

#### 1.1.5.7.2 Bacterias del ácido acético (BAA)

Son Gram-negativas, resistentes a los ácidos (hasta pH 2,6) y son aerobios, se incluye los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Este género *Gluconobacter* produce su energía a través de la oxidación incompleta de los azúcares (hidratos de carbono) o alcoholes que se derivan en las formas de ácido como por ejemplo, ácido glucónico de glucosa y ácido acético de etanol. (Jakob et al., 2012: 493-499)

Los *Acetobacter sp.* tienen la capacidad de oxidar el ácido acético en CO<sub>2</sub> y agua. (Gullo y Giudici, 2008: pp.46-53) Las AAB se pueden encontrar de forma natural en los hábitats de plantas que contengan carbohidratos o ricas en etanol. Actualmente son muy significativos en el área comercial en la producción de ácido acético. (Jakob et al., 2012: pp. 493-499)

En realidad las AAB no son muy consideradas, ya que sólo se puede encontrar en pequeñas cantidades en los granos de kéfir de agua, probablemente porque el oxígeno es escaso en este entorno y sólo se añade en el lavado y proceso inicial. (Gulitz et al, 2013: pp.1082-1091)

#### 1.1.5.7.3 Bifidobacterias

Son Gram-positivas y son microorganismos sacarolíticos. El ácido láctico es uno de sus metabolitos principales, estos fueron clasificados como bacterias del ácido láctico por mucho tiempo. (Ballongue, 1993: pp.357-428) Los monosacáridos se metabolizan dentro de la llamada "shunt bifidus" que es distinto de la vía de homo y heterofermentativas de las bacterias del ácido

láctico. (Gulitz et al., 2013: pp.1082-1091) En lugar de aldolasa y la glucosa-6-deshidrogenasa fosfato las bifidobacterias producen fosfoacetolasa fructosa-6-fosfato, la enzima clave en su ruta metabólica y el marcador taxonómico para Bifidobacteriaceae. Los rendimientos de la derivación bifidus en acetato es de 1,5 mol, lactato 1 mol y 2,5 moles de ATP de 1 mol de glucosa. (Kaditzky, 2008)

La mayoría de las especies de *Bifidobacterium* pueden ser aislados del intestino humano y animal y crecen estrictamente en condiciones anaeróbicas a 37 ° C. (Gulitz et al., 2013: pp.1082-1091) (Dobson et al., 2011: pp.56-62) Con los métodos de detección se puede identificar la *Bifidobacterium* sp. en el kéfir de leche, así como en los granos de kéfir de agua.

La *B. psychraerophilum* es la única especie cultivable en los granos de kéfir de agua ya que es una especie de *Bifidobacterium* poco común. (Gulitz et al. 2013: pp.1082-1091) Esta especie es capaz de crecer a temperaturas bajas (hasta 4 ° C) (Gulitz et al. 2013: pp.1082-1091) y bajo condiciones aeróbicas se llama *psychraerophilum* ("frío y aire amante" o "cold and air-loving"); aunque su óptimo crecimiento anaeróbicamente es a 37 ° C. (Simpson et al., 2004: pp.401-406)

#### 1.1.5.7.4 *Levaduras*

Las levaduras catabolizan la glucosa en la vía de la glucólisis en general al piruvato; en ausencia de oxígeno tiene que ser re-oxidado durante la fermentación etanólica. Tras la fermentación el piruvato se convierte en acetaldehído y CO<sub>2</sub> y después acetaldehído se reduce al etanol catalizada por la alcohol deshidrogenasa. (Dickinson et al., 2006: pp.215-217)

Las *Saccharomyces* (*S.*) están presentes en los granos de kéfir de agua, es una levadura anaeróbica facultativa y son capaces de catabolizar glucosa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. En condiciones anaeróbicas fermentan glucosa a etanol. Si nos referimos a la respiración en un medio que contiene glucosa (más de 0,1%) de *S. cerevisiae* es limitado y cuenta menos que 10% de catabolismo de la glucosa a causa de la llamada efecto Crabtree o represión de la glucosa. En presencia de enzimas respiratorias y gluconeogénicas de glucosa no son sintetizados más y el piruvato emergente se canaliza a etanol incluso en presencia de oxígeno. (Barnett, 2005: pp.835-894) medio del kéfir de agua es un alto nivel de azúcar, el principal azúcar utilizado para la preparación es la sacarosa. El disacárido sacarosa se hidroliza extracelularmente por la invertasa de levadura a la fructosa y glucosa, después, estas hexosas son transportadas a las células. (Dickinson et al., 2006: pp.215-217)

La *Zygorulasporea florentina* es el principal representante de las levaduras en los granos de kéfir de agua que fue llamado *Zygosaccharomyces Florentinus* antes de su clasificación en el año 2003; las *Zygosaccharomyces* son levaduras osmotolerantes y por lo tanto son capaces de crecer en sustratos con altas concentraciones de azúcar. Estas especies pueden causar deterioro en los alimentos, pero durante la fermentación lo hacen de manera deseable. (Gulitz et al., 2011: pp.284-288)

#### 1.1.5.7.5 Exopolisacáridos

Los polisacáridos son compuestos de alto peso molecular, se componen de monosacáridos glucosídicos. En la naturaleza, los polisacáridos están muy extendidos conformando las estructuras de sustancias (por ejemplo, celulosa o quitina), como materiales de reserva (por ejemplo, almidón o glucógeno) y como sustancias ligantes de agua (por ejemplo, agar o pectina). Sus propiedades funcionales dependen de los diversos tipos de enlace y ramificación así como su peso y monómeros de azúcar. (Belitz et al., 2001: pp.26-32)

Los polisacáridos microbianos que son excretados extracelular se denominan exopolisacáridos (EPS). Los EPS se producen como agentes o cuerpos protectores contra la deshidratación, diferentes ataques como toxinas, antibióticos o fagos, la depredación por protozoos y estrés osmótico. Otra función es que las bacterias pueden adherirse a las superficies sólidas con EPS para construir formaciones de biopelículas. (De Vuyst et al., 1999: pp.153-177)

Los EPS que se agrupan a la superficie celular exhiben una apariencia capsular mientras que EPS difusibles libres son viscosos. En algunos casos, ambos tipos pueden ser producidos por el mismo organismo. (Cerning, 1990: pp.113-130); se pueden clasificar a lo largo de su composición de monómeros de azúcar. Los Heteropolisacáridos (HEPS) se conforman de diferentes monómeros de azúcar con la repetición de unidades precursoras. Estas unidades se crean intracelularmente y extracelularmente polimerizan. Este es un proceso que depende de energía (De Vuyst et al., 1999: pp.153-177)

Según (De Vuyst et al., 1999: pp.153-177), los homopolisacáridos (saltos) constituyen en un tipo de monómero; EPS compuestos de glucosa son llamados glucanos, los fructanos de fructosa, así se pueden diferenciar a lo largo de sus tipos dominantes.  $\alpha$ -D-glucanos con alfa-1,6-vínculos y las ramas en las posiciones 3, 2 y 4 se denominan dextranos, mientras que la ramificación es cepa específica. Las cepas de varios *Leuconostoc* sp. se sabe que producen dextranos. Los Mutans que son producidas por estreptococos, muestran principalmente alfa-1,3-vínculos, y alternan que es

producida por diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides* contiene ambos tipos de enlace alterna. Los representantes de los fructanos son levanos, con  $\beta$ -2,6- $\beta$ -vínculos y 2,1 ramificación, y la inulina con  $\beta$ -2,1 como el principal tipo de vinculación. Los Homopolisacáridos son sintetizados por glicosiltransferasas, mientras que glucansucrases catalizan la producción de glucanos y fructansucrases estos de fructanos. (De Vuyst et al., 1999: pp.153-177)

La actividad transferasa de glicosiltransferasas conduce a EPS porque los monómeros de azúcar se transfieren a las crecientes cadenas de polisacáridos; así varias especies de bacterias de ácido láctico son capaces de producir EPS durante la fermentación. (Kaditzky, 2008) (Waldherr, 2009: pp.672-678)

#### *1.1.5.8 Análisis Microbiológico del kéfir de Agua*

Se puede cultivar en los siguientes medios de cultivo: Rogosa Agar (AR) y De Man, Rogosa, y Sharpe (MRS), específico para *Lactobacillus*; Brain Heart Infusion (BHI) agar, que se utiliza para el recuento global de las bacterias; Sabouraud Dextrosa-Agar (SDA), por levaduras y hongos filamentosos; Tioglicolato Agar (TA), por *Streptococcus*, *Acetobacter* y *Leuconostoc*; Agua de Coco Agar (CWA) y agua de coco + Agar extracto de levadura (arcilla), para el crecimiento de varios géneros. (Bergmann et al., 2009: pp.1022-1026)

#### *1.1.5.9 Preparación del kéfir de agua*

El kéfir de agua se prepara en una solución de sacarosa (100g / l) en 1 l de agua filtrada a temperatura ambiente; se coloca los gránulos de Kéfir en una jarra de vidrio con el sustrato seleccionado. (Gulitz et al., 2011: pp.284-288)

El frasco se lo tapa con una tela porosa y un cordel de cocina evitando así que entre en contacto con moscas del género *Drosophila* o cualquier otro tipo de contaminación. (Moreno, 2005). La fermentación se lleva a cabo a 21 ° C por dos a tres días, cuanto más tiempo tenga la fermentación más fuerte será su sabor. (Gulitz et al., 2011: pp.284-288)

Luego se criba en una jarra conservando los gránulos de kéfir de agua que se pueden volver a cultivar inmediatamente o se pueden almacenar en el agua en el refrigerador hasta por una semana. (Moreno, 2005)

#### *1.1.5.10 Producción de biomasa a partir del kefir de agua*

Para producir, en forma doméstica, el mayor rendimiento de biomasa del kefir de agua a partir de sustratos azucarados de relativo bajo costo de la industria azucarera pueden ser (piloncillo,

panela, melaza, melado, mascabado, azúcar morena y azúcar blanca) y el jugo de betabel, tuna y piña. (Díaz Garcés et al., 2015)

Se utiliza diferentes concentraciones de cada sustrato, así como varias temperaturas y tiempos de incubación. La biomasa de tибicos se puede medir por peso húmedo drenado (g/100 ml); la tasa específica de crecimiento se calcula en g/hora. (Díaz Garcés et al., 2015)

El valor más alto en la producción de tибicos (78.8g/100 ml) se obtiene con 50 g de piloncillo o panela en el medio de cultivo, 29-C y 72 horas de incubación y la mayor productividad de biomasa (1.9 g/hora). (Díaz Garcés et al., 2015)

#### **1.1.6 Beneficios del kefir de agua**

Son muchos los efectos beneficios que atribuye el kefir de agua por parte de los consumidores tales como: tratar padecimientos del aparato digestivo, úlceras, colitis ulcerosa, intolerancia gástrica, colon irritable, divertículos, entre otros (Palmetti, 2010); sin embargo, algunos de estos atributos no tienen un soporte científico establecido. (Teixeira, 2011)

Un estudio mostró que comparando el poder cicatrizante del carbohidrato obtenido del kéfir de agua con el poder cicatrizante del neomycin-clostebol (Combinación de neomicina, un antibiótico de amplio espectro con clostebol, esteroide de uso tópico que aumenta la velocidad de cicatrización), ambos aplicados de forma tópica en heridas inducidas en ratas de laboratorio; el carbohidrato de kéfir fue capaz de inhibir la acción inflamatoria de manera similar que el neomycin-clostebol en heridas; sin embargo, esta droga es conocida por presentar efectos colaterales como problemas hepáticos, disfunciones reproductivas y riesgos neoplásicos. Por tal razón se recomienda el uso de una solución a base de gránulos de kéfir de agua frente al neomycin-clostebol. (Thomson, 2004) (Moreira, 2008: pp.356-361) (Schneedorf, 2012)

Otro de los beneficios de consumir el kéfir de agua es la presencia de *Lactobacillus plantarum*; según la investigación desarrollada por (Wang, 2009) en la cual se agregó *L. plantarum* liofilizado a una dieta alta en colesterol, se analizó que ratas no hubo variación en cuanto a su peso corporal, ingesta de comida y eficiencia de alimentación. Por otro lado, se presentó una reducción de colesterol sérico, LDL (Lipoproteína de baja densidad) y los niveles de triglicéridos. También se produjo una gran disminución en el colesterol así como de triglicéridos en el hígado, demostrando la disminución del colesterol y no se redistribuyó en la sangre o en el hígado.

Según (Wang, 2009) es importante la reducción de LDL como del colesterol total debido a que elevadas cantidades de estos están altamente relacionadas con riesgo de enfermedades coronarias. Su reducción en hombres hipocolesterolémicos puede disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares.

Además, se notó que la concentración de ácido propiónico en las heces de los animales se incrementó significativamente, casi tres veces más con relación al grupo control (que no fue alimentado con *L. plantarum*); esto indica que una de las vías de síntesis de colesterol se vio afectada, reduciendo de esta forma su concentración. (Golowczyc, 2007: pp.264-273)

Otros estudios realizados determinaron que *Lactobacillus kéfiri* presente en los gránulos de kéfir tiene la capacidad de antagonizar la invasión y/o adhesión de *Salmonella enteritidis*. La *Salmonella* es uno de los patógenos causantes de una variedad de enfermedades como fiebre entérica, bacteriemia, infecciones focales y enterocolitis principalmente en pollos y aves de corral; y es una de las mayores fuentes de infección intestinal. (Golowczyc, 2007: pp.264-273)

### ***1.1.7 Sustrato para la producción del kéfir de agua***

#### ***1.1.7.1 Panela***

Es un producto alimenticio derivado del jugo de la caña de azúcar (*saccharum officinarum L*), este azúcar se considera natural e integral, no centrifugado y sin refinamiento. (De los Reyes, 2011)

##### ***1.1.7.1.1 Composición física***

Su forma es sólida, su presentación comercial esta bloques rectangulares, semiesféricos o granulada. En bloque posee una humedad media de 7 % lo que acorta su vida útil en comparación con la panela granulada y edulcorantes con menores porcentajes de humedad. (De los Reyes, 2011)

##### ***1.1.7.1.2 Composición química y bioquímica***

Contiene carbohidratos, minerales, proteínas, vitaminas esenciales para el organismo. Dentro de los carbohidratos que se encuentran en la panela se encuentra en mayor proporción la sacarosa y menor cantidad los azúcares reductores o invertidos como la glucosa y la fructosa. Estos azúcares

poseen una prioridad de uso inmediato para el organismo ya que cuenta con una ventaja energética debido a que estos son rápidamente metabolizados por el cuerpo.

**Tabla 4-1.** Composición nutricional de la panela.

<b>COMPONENTE / VALOR</b>	<b>PANELA EN BLOQUE</b>	<b>PANELA GRANULADA</b>
Carbohidratos, g/100g	88,3	97,0
Sacarosa, g/100g	79,4	89,5
Azúcar invertido, g/100g	8,5	6,0
N2 total, g/100g	0,08	....
Proteínas, g/100g	0,46	0,74
Grasa, g/100g	0,21	0,35
Fibra, g/100g	0,12	0,01
Energía en cal/100g	321,5	377,5
pH	6,1	6,0
humedad, g/100g	7,1	1,9
Ceniza, g/100g	1,29	1,7
<b>Minerales en mg/100g</b>		
Potasio	116,7	535,0
Calcio	172,8	170,0
Magnesio	61,7	29,0
Fósforo	60,4	133,0
Sodio	56,0	23,0
Hierro	5,3	2,5
Manganeso	1,2	....
Zinc	1,5	2,8
Fluor	5,7	....
Cobre	0,4	0,6

**Fuente:** (Carlosama Chamorro, 2009)

## 1.2 Marco conceptual

- BAA (Bacterias Ácido Acéticas): Son una agrupación de microorganismos Gram negativos que muestran una asimilación anaeróbica, estos producen a su vez una fermentación homoacética, lo cual se fundamenta en la habilidad para transformar lactato a acetato.
- BAL (Bacterias Ácido lácticas): Es un grupo heterogéneo de microorganismos cuya característica define la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares.
- ATP (Adenosin Trifosfato): Es un nucleótido importante en la adquisición de energía celular. Se conforma por una base nitrogenada unida al carbono de un azúcar. Es la fuente fundamental de energía que proporciona casi en su totalidad las funciones celulares.

- Bifidobacterias: Son una agrupación de microorganismos Gram-positivos, las bifidobacterias que se radican en el colon favorecen la asimilación nutricional, se relacionan con una menor frecuencia de hipersensibilidad alérgica y que a su vez advierten también la expansión de determinadas formas de tumores.
- Catalizador: Componente que disminuye la energía de activación indispensable entre dos sustancias para que se reactiven, conservándose sin alteración en el término de la reacción.
- Cepas: Es un cúmulo de microorganismos que se forman a base de una colonia original que distribuye determinadas características fisiológicas, bioquímicas, genéticas, patológicas (una o más de estas características) que los diferencian de otras cepas.
- Cribado: Es la forma de utilización de pruebas simples en una población sin enfermedad con el propósito de averiguar de forma ordenada las personas que aún no presentan ningún síntoma a pesar de presentar una determinada enfermedad.
- Destilación: Proceso por el que la sustancia volátil de una mezcla se separa de otra que no lo es mediante evaporación y posterior condensación de la misma.
- Dextrano: Es un componente originado de la glucosa. Se crea de manera natural por los microbios que conviven en la tierra. El dextrano también es un suplente del plasma sanguíneo (la parte líquida de la sangre), y a su vez es un constituyente las lágrimas artificiales utilizadas para lidiar la sequedad ocular.
- Enterotoxina: Es una sustancia dañina para el sistema digestivo que la producen ciertas bacterias.
- Equimolares: Es una mezcla de dos o más componentes que se encuentran presentes en la misma cantidad de moles.
- Fermentación: Es un procedimiento catabólico de oxidación incompleta, el cual no necesita de oxígeno, y el resultado al término es una composición orgánica. De acuerdo a los resultados finales.
- Filamentoso: Perteneciente a algo que es como un hilo o que es capaz de ser estirado hasta lograr una estructura parecida a un hilo.
- Glucolisis: Camino metabólico cuyo fin es oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para la célula
- Gluconeogénicas Es una ruta metabólica anabólica que permite la biosíntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos. Incluye la utilización de varios aminoácidos, lactato, piruvato, glicerol y cualquiera de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (o ciclo de Krebs) como fuentes de carbono para la vía metabólica.
- Heterofermentativo: Se presenta como una fermentación que crea más de un producto, por ejemplo, alcohol y ácido láctico.
- Heteroláctica: Fermentación bacteriana que desemboca en una combinación de ácido láctico y otros productos.

- Hidrólisis: Es una reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar parte de otra especie química. Esta reacción es importante por el gran número de contextos en los que el agua actúa como disolvente.
- Homofermentativo: Sólo producen ácido láctico a partir de azúcares.
- Homoláctica: Es la fermentación cuyo único producto final es el ácido láctico
- Incubación: Progreso de una alteración de la salud en un ser vivo que comienza con el contagio y se desarrolla hasta la aparición de los síntomas.
- Kefir: Es un producto lácteo fermentado mediante hongos y bacterias. En el kefir la leche fermenta mediante una reacción lacto-alcohólica, y por tanto anaeróbica; la lactosa de la leche se transforma en ácido láctico y se produce anhídrido carbónico y alcohol.
- Levaduras: Son organismos eucariotas unicelulares, los cuales se reconoce por su habilidad para producir la descomposición a través de fermentación de distintos somas orgánicos, fundamentalmente los azúcares o hidratos de carbono, creando así distintas sustancias.
- Microbiota: Es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo humano.
- Mutagénesis: Es aquella modificación del material genético que resulta estable y transmisible a las células hijas que surgen de la mitosis.
- Osmotolerante: Capacidad que tienen las levaduras para crecer en un medio con altas concentraciones de azúcares.
- Setas: Conjunto de hongos pluricelulares (basidiomicetos) que incluye muchas especies.

## **CAPITULO II**

### **2. MARCO METODOLÓGICO**

#### **2.1 Hipótesis y especificaciones de las variables**

##### *2.1.1 Descripción de hipótesis y variables*

###### *2.1.1.1 Hipótesis*

Mediante fermentación sumergida con microorganismos tibetanos y sustratos azucarados se produce una bebida hidratante nutritiva para deportistas y biomasa para alimentación animal, ambas de buena calidad.

###### *2.1.1.2 Indicadores*

En esta investigación se determinaron los siguientes indicadores:

###### Indicadores físicos:

Temperatura, biomasa en peso.

###### Indicadores bromatológicos:

Proteína, Calcio, Fosforo, microelementos (Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc), vitaminas grupo B.

###### Indicadores microbiológicos:

Microorganismos tibetanos, clostridium sulfitorreductoras, coliformes totales y fecales, hongos y levaduras.

###### Indicadores bioquímicos:

pH, acidez total, grados brix, azúcares reductores, ácido láctico

###### Indicadores organolépticos:

Color, sabor, olor.

#### **2.2 Tipo y diseño de investigación**

La investigación es tipo exploratoria con la aplicación de un diseño experimental. El diseño experimental es utilizado será completamente aleatorizado que contempla 5 tratamientos con 3 repeticiones; cada uno bajo un modelo experimental bifactorial (factor 1 – tipo de sustrato; factor 2 – nivel de sustrato).

### **2.3 Unidad de análisis**

Corresponde a un frasco de vidrio de 1 litro en donde cada frasco corresponde a una repetición dentro del tratamiento.

### **2.4 Población de estudio**

La población de estudio corresponderá a 15 L de fermentación dividido en 15 frascos de 1 L cada uno.

### **2.5 Tamaño de muestra**

Las muestras a tomar son de 20 mL cada uno para los distintos análisis físicos, bromatológicos, microbiológicos y bioquímicos; las muestras para los análisis organolépticos son de 10 ml tomados de cada litro o frasco.

### **2.6 Selección de muestra**

Las muestras serán colectadas según un muestreo completamente al azar en cada repetición de todos los tratamientos.

### **2.7 Técnicas de recolección de datos**

#### ***2.7.1 Ubicación del proyecto***

Este proyecto se lo desarrolló en los laboratorios de: Biotecnología y Microbiología Animal “LABIMA” y Procesamiento de Alimentos de la Facultad de Ciencias Pecuarias, HPLC de la Facultad de Ciencias y el de Análisis Ambientales, Análisis Instrumental y Aguas de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH localizados en el Km 1 ½ de la Panamericana Sur.

**Tabla 1-2. Condiciones meteorológicas - ESPOCH.**

PARÁMETROS	PROMEDIO
Temperatura (°C)	14,20
Humedad Relativa (%)	66,41
Precipitación (mm)	550,80
Heliofania (h/luz)	165,15

Fuente: (ESPOCH, 2014)

## 2.7.2 *Materiales y equipos*

### 2.7.2.1 *Equipos de laboratorio*

- Termómetro digital
- Potenciómetro
- Refractómetro
- Equipo Macro Kjeldahl
- Matraces Erlenmeyer
- Agitador magnético
- Estufa
- Balanza analítica
- Vidriería de laboratorio
- Vórtex
- Caja para cultivo anaeróbico
- Microscopio
- Cámara de flujo laminar
- Cuenta colonias
- Computadora
- Refrigerador
- Hielera
- Espectrofotómetro
- HPLC
- Equipo de ultrasonido
- Baño María
- Bomba de vacío
- Panel de Catación

- Termo cooler

#### 2.7.2.2 *Reactivos*

- Agar MRS para bacterias ácido lácticas
- Agar Clostridium perfringers para bacterias clostridium sulfitorreductoras
- Agua destilada
- Agua desionizada
- Agua bi-destilada grado HPLC
- Aceite de inmersión
- Ácido ascórbico
- Ácido clorhídrico
- Ácido fosfórico
- Ácido láctico
- Ácido oxálico
- Ácido nítrico
- Ácido sulfúrico
- Alcohol acetona
- Alcohol antiséptico
- Almidón soluble
- Azul de metileno
- Buffer de pH 4
- Cristal violeta
- Clorhidrato de hidroxilamina
- EDTA
- Fenolftaleína
- Fosfato diácido de potasio
- Hexaciano ferrato (II) de potasio
- Hexanosulfonato de sodio
- Hidróxido de sodio
- Lugol
- Molibdato de amonio
- Murexida (purpurato de amonio)
- Óxido de fósforo (III)
- o-fenantrolina
- Safranina
- Sulfato de cobre

- Sulfato ferroso hexahidratado
- Sulfato amónico férrico
- Tartrato de sodio y potasio
- 2,6 – diclorofenolindofenol

### 2.7.2.3 *Materiales*

- Acrodiscos
- 15 frascos de 1l de vidrio con tapa
- 3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de coliformes totales y fecales
- 3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de levaduras y Mohos
- Etiquetas
- Frascos de vidrio para muestras
- Frascos de plástico para muestras
- Marcadores para etiquetas
- Materiales de limpieza
- Azúcar blanca
- Azúcar Morena
- Melaza
- Jugo de Caña
- Panela
- Pan integral
- Tamiz de plástico
- Viales para HPLC
- Vasos de plástico desechables

### 2.7.3 *Tratamientos y diseño experimental*

La presente investigación trata de la “CARACTERIZACIÓN DE UNA BEBIDA Y BIOMASA PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL MEDIANTE FERMENTACIÓN SUMERGIDA CON MICROORGANISMOS TIBETANOS” la cual fue elaborada mediante la adición de microorganismos tibetanos (tibicos) y varios sustratos azucarados: azúcar blanca, azúcar morena, melaza, jugo de caña y panela; los detalles constan en la tabla 2-2.

**Tabla 2-2.** Composición de la bebida y microorganismos utilizados en la fermentación sumergida.

Bebida	Sustrato único	Microorganismos tibetanos	Agua destilada
T1	3,2%	16,1%	80,7%
T2	4,8%	15,9%	79,3%
T3	6,3%	15,6%	78,1%
T4	7,7%	15,4%	76,9%
T5	9,1%	15,2%	75,7%

**Fuente:** (Pauca Barreno, 2015)

El esquema del experimento para la presente investigación se presenta en la siguiente tabla:

**Tabla 3-2.** Esquema del experimento.

Tratamientos	Repeticiones	UA	Total
5 - Un sustrato	3	1	15

**Fuente:** (Pauca Barreno, 2015)

UA: Corresponde la Unidad de Análisis (11).

#### 2.7.4 Mediciones experimentales

Los indicadores experimentales que se evaluaron en esta investigación fueron:

Evaluación física:

- Temperatura (°C)
- Biomasa (gramos)

Evaluación bromatológica:

- Proteína (%)
- Calcio (ppm)
- Fósforo (ppm)
- Microelementos: Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc ( ppm)
- Vitamina B6 (mg/100g)

Evaluación microbiológica:

- BAL - Microorganismos tibetanos (UFC/ml)
- Clostridium sulfitorreductoras (UFC/ml)
- Coliformes totales y fecales (UFC/ml)
- Hongos y levaduras (UPC/ml)

Evaluación bioquímica:

- pH (pH)
- Acidez total (mg/l)
- Grados brix (°Bx)
- Azúcares reductores (%)
- Ácido láctico (ppm)

Evaluación organoléptica:

- Color (sensorial)
- Sabor (sensorial)
- Olor (sensorial)

#### *2.7.5 Análisis estadístico*

Los resultados experimentales físicos, bromatológicos, microbiológicos, bioquímicos y organolépticos fueron sometidos a los siguientes análisis:

- Comparación de medias: análisis Anova, comparaciones múltiples post hoc – Tukey, con nivel de significancia del 5%.
- Tablas de contingencia comparativas.

#### *2.7.6 Procedimiento experimental*

**Primera Fase. Identificación del sustrato azucarado más adecuado para la elaboración de la bebida y producción de biomasa con microorganismos tibetanos.**

La fase inicial pretendió encontrar el mejor sustrato para proporcionar las mejores características para la bebida y producir mayor cantidad de biomasa para alimentación animal, detallado en la siguiente tabla.

**Tabla 4-2.** Composición de la bebida y biomasa aplicando diferentes sustratos azucarados.

Bebida	Sustratos	Niveles	Biomasa	Agua destilada
	Azúcar blanca		6,5%	29,0%
		12,1%	27,3%	60,6%
Azúcar morena		6,5%	29,0%	64,5%
		12,1%	27,3%	60,6%
Jugo de caña		6,5%	29,0%	64,5%
		12,1%	27,3%	60,6%
Melaza		6,5%	29,0%	64,5%
		12,1%	27,3%	60,6%
Panela		6,5%	29,0%	64,5%
		12,1%	27,3%	60,6%

**Fuente:** (Pauca Barreno, 2015)

Esta preparación permaneció por 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 80, 120, 144 horas a una temperatura ambiente (14 °C promedio en la ciudad de Riobamba) realizando los análisis respectivos en cada espacio de tiempo.

Luego se procedió a evaluar la vida de anaquel de la bebida para conocer la duración del producto en percha efectuada una vez por semana durante cuatro semanas.

### **Segunda Fase. Caracterización de la bebida junto con la biomasa mediante fermentación sumergida a escala de laboratorio con microorganismos tibetanos.**

Se elaboró la bebida a partir de microorganismos tibetanos (biomasa) en fermentadores rústicos del laboratorio con una producción de 1 litro en cada repetición.

Para la elaboración se colocó un sustrato elegido junto con los microorganismos tibetanos (biomasa) en agua destilada, esta preparación permaneció por 72 horas a una temperatura ambiente (14 °C promedio en la ciudad de Riobamba). Esta bebida, después del tiempo indicado, produjo una fermentación ácida, predominantemente láctica.

Se aplicó un muestreo dirigido, considerando las 3 réplicas de los 5 tratamientos de la fermentación, para ello se tomó muestras de 20 y 10 ml de cada recipiente o repetición a las 72 horas, tratando de que la muestra provenga del centro del recipiente. En todo el proceso de muestreo se aplicaron buenas prácticas de laboratorio para reducir riesgos de contaminación

ambiental. Estas muestras se colocaron en recipientes estériles de vidrio con tapa rosca y codificados, además se refrigeraron hasta iniciar los análisis respectivos.

### **2.7.7 Metodología de Evaluación**

La metodología de la evaluación se determinó de la siguiente manera:

#### **2.7.7.1 Evaluación física**

- Temperatura

La temperatura de la bebida se determinó con la ayuda de un termómetro digital, siendo medido en grados Celsius a las 72 horas, de forma directa en el líquido resultante.

- Biomasa en peso.

El peso se logró determinar filtrando con un tamiz la biomasa del líquido resultante a las 72 horas por medio de una balanza electrónica, medido en gramos.

#### **2.7.7.2 Evaluación bromatológica**

- Proteína

Para la determinación de la proteína en la bebida se analizó como nitrógeno total (%), para ello se toman muestras líquidas de la fermentación hecha a las 72 horas; el método consistió en:

- Medir 1 ml de muestra en el tubo Kjeldahl, adicionar 7g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,22g de CuSO<sub>4</sub>, y agregar 25 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Colocar los tubos Kjeldahl en el Speeddigester.
- Encender el Speeddigester correr la digestión por 2 horas.
- Al final de la digestión automática se confirmó el mensaje “digestión finalizada”.
- Conectar el tubo al bulbo de la Unidad de Destilación y, sumergir la punta que baja del condensador en una solución de ácido estandarizado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2N) y añadir de 5 a 7 gotas de indicador rojo de metilo en el receptor, girando el Erlenmeyer para mezclar el contenido completamente.
- Colarse en el programa 2 de la Unidad de destilación que está debidamente programado para trabajar a una potencia de 70% y un tiempo de 7 min.

- Presionar Reagent 1 que deberá estar programado para enviar 50 ml de agua desionizada.
  - Presionar Reagent 2 que deberá estar programado para enviar 100 ml de NaOH al 40 %
  - Presionar Start para su debida destilación hasta que haya sido destilado los 7 min.
  - Quitar el recipiente y sacudir la punta de la manguera del condensador.
  - Estandarizar cada solución estándar con estándares primarios.
  - Titular el exceso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> estandarizado 0,2N en el destilado con la solución de NaOH estandarizado 0,2N.
  - Registrar datos.
- Calcio (ppm)
- En un Erlenmeyer de 250 ml, colocamos 10 ml de muestra y diluimos con agua hasta obtener 30ml.
  - Añadir unos miligramos de indicador murexida en NaCl al Erlenmeyer que contiene la dilución con la muestra; luego añadimos 2 ml solución de NaOH al 10 %, hasta obtener color rojizo - rosado.
  - Titular con EDTA 0,01 M con una bureta, hasta que tome un color violeta - azulado.
  - Anotamos el volumen de EDTA consumido.
  - Aplicamos la fórmula donde será expresado su resultado en ppm:

(alícuota = 10 ml)

$$\text{ppm Ca}^{+2} = \text{VMUR} \times \text{MEDTA} \times 40 \times 1000/\text{alícuota}$$

VMUR: volumen de la muestra diluída con el indicador murexida

MEDTA: gasto de EDTA.

- Fósforo (ppm)

Para poder determinar fósforo en la bebida es necesario preparar con anterioridad las siguientes soluciones:

*Solución stock de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:*

Pesar 0.1915 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> seco. Disolver con agua desionizada y aforar a 1000 mL. Esta solución contiene 100 ppm de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

*Solución de trabajo:*

Diluir la solución anterior a una concentración final de 20 ppm de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

*Solución reductora:*

Se compone de tres reactivos:

- 0.7800 g de molibdato de amonio en 39 mL de agua
- 1.056 g de Ácido ascórbico en 60 mL de agua
- 11 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado en 125 mL de agua

Mezclar los tres reactivos antes y aforar a 250 mL con agua desionizada.

*Preparación de la curva de calibración:*

- Preparar 6 estándares en matraces de aforación de 50 ml correspondientes a 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 ppm. Luego, añadir a cada matraz 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml de solución de trabajo y 20 ml de solución reductora para aforar a 50 ml con agua destilada.
- Incubar durante 45 minutos a 50°C. Después del tiempo de incubación leer la absorbancia a 830 nm en el espectrofotómetro UV/VIS empleando el blanco en la calibración del equipo (corresponde al de 0 ml).

*Preparación de la muestra:*

- Tomar 1 ml de la bebida y desgasificar con un equipo de ultrasonido, aforarnos a 50 ml; de esta solución tomar 5 ml, agregar 20 ml de solución reductora y aforar a 50 ml con agua destilada.
- Incubar durante 45 minutos a 50 °C. Después del tiempo de incubación leer la absorbancia a 830 nm frente al blanco (corresponde al de 0 mL).
- Anotar la absorbancia que se obtuvo.
- Se elabora una tabla para determinar la curva de calibración (Concentración en ppm P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> vs absorbancia a 830 nm) y armar una gráfica en Excel para la curva de calibración usando la concentración en ppm de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en las abscisas vs la absorbancia en el eje de las ordenadas.
- Obtener la ecuación de la recta y calcular el coeficiente de correlación (r), y emitir juicios respecto al valor obtenido.
- Calcular la concentración del P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en la bebida: interpolando en la gráfica, usando la ecuación de la gráfica obtenida.
- Determinar el contenido de fósforo presente en la bebida tomando en cuenta la dilución realizada y el factor estequiométrico para transformar P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en P.

- Microelementos: Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc (ppm)

*Hierro:*

*Reactivos utilizados:*

- Clorhidrato de hidroxilamina ( $\text{H}_2\text{NOH}\cdot\text{HCl}$ ) al 10% p/p. Preparar 10 ml por cada muestra.
- Buffer de pH 4 de ácido acético/acetato de sodio
- o-fenantrolina 25 mL al 0,3% p/p del monohidrato en agua. Aquí se agregan algunas gotas de ácido nítrico diluido para ayudar la disolución. Se guarda en un lugar oscuro. Se rechaza el reactivo cuando comience a tomar color.
- Solución patrón de 1000 mg/l de Fe preparado a partir de  $\text{FeSO}_4\cdot(\text{NH}_4)_2\cdot\text{SO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

*Preparación de la curva de calibración:*

- El intervalo de la curva de calibración es de 1 a 4 mg/l de Fe. Los estándares se preparan colocando la alícuota de la solución patrón de hierro en un vaso de precipitado agregando 0,5 ml de hidroxilamina y se ajusta el pH a 4, con la ayuda de HCl o NaOH 1 M (medir con un potenciómetro para realizar la medida del pH).
- Se agrega 2 ml de la solución buffer de pH 4 y se trasvasa cuantitativamente a un balón de 25 ml, donde se agrega 1 ml de la disolución de la o-fenantrolina, antes de aforar con agua destilada.
- Para la lectura de la señal en el espectrofotómetro UV – visible , se determina primero la longitud de onda de trabajo haciendo un barrido de absorbancia en función de la longitud de onda, colocando el blanco (agua en este caso) en la cubeta de referencia. La lectura de la absorbancia se realiza en el intervalo de 500 a 520 nm.

*Análisis de la muestra:*

- Coloque en un vaso de precipitación una alícuota de la muestra 1 ml, agregar 0,5 mL de hidroxilamina y ajustar el pH a 4 igual que con los patrones de calibración. Llevar esta solución a un balón de 25 mL
- Agregar 1ml de la disolución de la o-fenantrolina y medir la absorbancia; se ajusta el factor de dilución de la muestra de manera que la lectura se encuentre dentro del intervalo de la curva de calibración.

*Manganeso, Cobre y Zinc: Espectrometría de Absorción Atómica:*

- Manganeso 100 mg/L: Disolver 0,100 g de muestra en 10 mL de HCl conc., mezclar con 1 mL de  $\text{HNO}_3$  conc. y diluir a 1.000 mL con agua.

- Cobre 100 mg/L: Disolver 0,100 g de muestra en 2 mL de ácido nítrico conc., agregar 10 mL de HNO<sub>3</sub> conc. y diluir a 1.000 mL con agua.
- Zinc 100 mg/L: Disolver 0,100 g de muestra en 20 mL de ácido clorhídrico (1+1) y diluir a 1.000 mL con agua.

*Desarrollo:*

- Homogenizar la muestra y pesar de 10 a 15 gramos.
- Iniciar la incineración en manta calefactora y continuar en mufla a 450 – 500°C, hasta cenizas blancas (12 a 14 horas aproximadamente).
- Dejar enfriar y agregar 5 mL de ácido nítrico (1+1) y evaporar a sequedad en baño termostático. Repetir con 5 mL más de ácido.
- Disolver el residuo con agua desionizada caliente, filtrar y aforar a 25 ml.
- Medir la concentración en espectrofotómetro de absorción atómica con una curva estándar, en las condiciones para cada elemento.
- Preparar la curva estándar a lo menos con tres concentraciones escogidas dentro de las concentraciones límites aproximadas para la aplicación.
- Se expresara al final de la siguiente forma:

$$\text{mg/l elemento} = C \times 25/V$$

C : Concentración de la muestra.

V : Volumen de la muestra en l.

- Vitamina B6 (g/l)

*Preparación de la fase móvil:*

- Se preparó la fase móvil mezclando metanol, agua bi-destilada grado HPLC y ácido fosfórico 0.1 M en hexanosulfonato de sodio.
- Luego se procedió a agitar y filtrar con la ayuda de un Kitazato y una bomba de vacío.
- Se desgasificó la fase móvil en un baño de ultrasonido y se colocó en un frasco estéril y ámbar para su posterior uso.

*Determinación de condiciones del HPLC:*

Las muestras se analizaron en un equipo Shimadzu LC-10Ai con autoinyector, con una columna C18 de 15 centímetros, las condiciones del HPLC con las que se aplicó el análisis fueron las siguientes:

- Flujo de inyección: 0.8 ml/min.
- Temperatura: 29°C.
- Fase móvil: Ácido Fosfórico 0.1 M a un pH 4.5.
- Detector UV: onda de 270 nm.
- Concentración del estándar de 500 ppm.

*Preparación del estándar:*

- El estándar de piridoxina (vitamina B6) se diluyó en la fase móvil a una concentración de 500 ppm.
- Luego fueron filtradas con un acrodisco de 0.4 µm.

*Preparación de las muestras:*

- La muestra para determinar esta vitamina se preparó según (Fernández, y otros, 2001) para esto se coloca 20g de muestra y se agrega 24 ml de HCl 0.1 N.
- La mezcla se calienta a 80-100 °C en un baño de agua por 60 min, después enfriada y llevada a un volumen de 100 ml de HCl 0.1N.
- La muestra diluída fue filtrada con papel filtro No. 542 y filtrada nuevamente por un acrodisco de 0.4 µm para ser analizada por el HPLC.

*Análisis en el HPLC:*

- Se encendió el equipo y se esperó hasta que se adapte a los parámetros antes mencionados.
- Se corrió el estándar y posteriormente las muestras colocadas en viales para HPLC se llevó a las cedillas del equipo para el análisis.

*Interpretación de los resultados:*

- Una vez corridas las muestras el HPLC se analizó de acuerdo a los tiempos de retención, cada uno de los picos de las muestras comparando con el estándar y así podemos calcular las áreas de cada uno y con ello su cantidad.

### **2.7.7.3 Evaluación microbiológica**

- BAL - Microorganismos tibetanos (UFC/ml)

Para el análisis de BAL se tomó las muestras a las 72 horas; y consistió la metodología en:

*Preparación y esterilización del material de vidrio*

- Se enjuaga y se lava el material del laboratorio con abundante agua y detergente, se realiza al final un último enjuague con agua destilada.
- Se colocaron los tubos, pipetas y cajas Petri en las bolsas de esterilización.

- Se introdujo en un autoclave por 20 minutos a 121°C

#### *Preparación del medio de cultivo*

- Se procede a seguir las instrucciones de fábrica del medio de cultivo agar MRS que es 70 g del medio en 1000 ml de agua destilada.
- Se lleva la mezcla al agitador magnético hasta su disolución total y se codifica.
- Se esterilizó en el autoclave a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos
- Luego en la cabina de flujo laminar, una vez esterilizado el medio, se depositó en las cajas Petri estériles aproximadamente 20 ml por caja, se dejó en reposo hasta que cambie de estado en forma de un gel.
- La dilución de la bebida se realizó a la ( $10^{-3}$  y  $10^{-5}$ )
- Se puso en tres tubos de ensayo 9 ml de agua destilada, se tomó 1 ml de muestra de bebida y se colocó en el primer tubo de ensayo.
- Se agitó hasta homogenizar en el Vortex por de 60 segundos el primer tubo.
- Se tomó con la pipeta y se extrajo 1ml del primer tubo y se pasó al segundo para homogenizar por 30 segundos en el Vortex.
- Se tomó con la pipeta y se extrajo 1ml del segundo tubo y se pasó al tercero para homogenizar por 30 segundos en el Vortex.
- Se tomó con la pipeta y se extrajo 1ml del tercer tubo y se pasó al cuarto para homogenizar por 30 segundos en el Vortex.
- Se tomó con la pipeta y se extrajo 1ml del cuarto tubo y se pasó al quinto para homogenizar por 30 segundos en el Vortex.
- Se utilizó la técnica por difusión de superficie de placa.
- Se tomó en una pipeta 1 ml de muestra diluída correctamente ( $10^{-3}$  y  $10^{-5}$ ); se hizo el vertido en la caja Petri y se homogenizó la muestra en forma de 8 para una buena distribución de la muestra en la superficie.
- Se llevó a la estufa bajo condiciones de crecimiento 37°C a una caja de anaerobiosis donde se incubó por 24 – 48 horas y se colocó las placas en forma invertida en una caja de anaerobiosis.
- Se contabilizaron las colonias y se registró mediante un conteo en UFC/ml.
- Una vez obtenidas las colonias se hace la tinción Gram de la siguiente forma:
  - Tener 3 portaobjetos limpios.
  - Preparar un frotis de cada uno
  - Colocar una pequeña gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos limpio.  
Es necesaria muy poca cantidad de agua.

- Flamear con un mechero de alcohol el asa de siembra y dejar enfriar medio minuto. Tomar, en condiciones asépticas, una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido y transferirlo a la gota de agua.
  - Remover la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida para facilitar su secado.
  - Esperar hasta que el líquido se evapore o acelerar su evaporación acercando y alejando el portaobjetos a la llama del mechero de alcohol por períodos cortos de 2 segundos aproximadamente. En este caso hay que tener mucha precaución de no calentar demasiado el portaobjetos pues las células pueden deformarse o romperse.
  - Teñir con cristal violeta agregando suficiente colorante y dejar que actúe durante 1 minuto.
  - Lavar suavemente con agua.
  - Inundar suavemente con el mordiente, yodo de Gram, y dejar actuar durante 1 minuto.
  - Lavar suavemente con agua.
  - Decolorar con alcohol etílico al 95%.
  - Lavar suavemente con agua.
  - Agregar la safranina para la tinción de contraste.
  - Lavar suavemente con agua.
  - Secar la preparación.
  - Explorar al microscopio con el objetivo 100X oil con una inmersión de aceite.
- 
- Clostridium sulfitorreductoras (UFC/ml)

Para el análisis de *Clostridium perfringens* se tomó las muestras a las 72 horas; y consistió la metodología en:

*Preparación y esterilización del material de vidrio*

- Se enjuaga y se lava el material del laboratorio con abundante agua y detergente, se y al final un último enjuague con agua destilada.
- Se colocaron los tubos, pipetas y cajas Petri en las bolsas de esterilización.
- Se introdujo en un autoclave por 20 minutos a 121°C

*Preparación del medio de cultivo*

- Se procede a seguir las instrucciones de fábrica del medio de cultivo agar *Clostridium perfringens* que es 23 g del medio en 500 ml de agua destilada.
- Se lleva la mezcla al agitador magnético hasta su disolución total y se codifica.
- Se esterilizó en el autoclave a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos
- Luego en la cabina de flujo laminar, una vez esterilizado el medio, se deposita en las cajas Petri estériles aproximadamente 20 ml por caja, se dejó en reposo hasta que cambie de estado en forma de un gel.
- La dilución de la bebida se realizó a la ( $10^{-1}$  y  $10^{-3}$ )
- Se puso en tres tubos de ensayo 9 ml de agua destilada, se tomó 1 ml de muestra de bebida y se colocó en el primer tubo de ensayo.
- Se agitó hasta homogenizar en el Vortex por de 60 segundos el primer tubo.
- Se tomó con la pipeta y se extrajo 1ml del primer tubo y se pasó al segundo para homogenizar por 30 segundos en el Vortex.
- Se tomó con la pipeta y se extrajo 1ml del segundo tubo y se pasó al tercero para homogenizar por 30 segundos en el Vortex.
- Se utilizó la técnica por difusión de superficie de placa.
- Se tomó en una pipeta 1 ml de muestra diluida correctamente ( $10^{-1}$  y  $10^{-3}$ ); se hizo el vertido en la caja Petri y se homogenizó la muestra en forma de 8 para una buena distribución de la muestra en la superficie.
- Se llevó a la estufa bajo condiciones de crecimiento 37°C a una caja de anaerobiosis donde se incubó por 24 – 48 horas y se colocó las placas en forma invertida en una caja de anaerobiosis.
- Coliformes totales y fecales (UFC/ml)

Para las Coliformes totales se tomó muestras de 72 horas; con el siguiente método:

- Se preparó la muestra y las diluciones de la bebida ( $10^{-3}$ ).
- Se colocó la placa Petrifilm™ Coliformes 3M en la Cabina de Flujo Laminar y se levantó la película superior.
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó 1ml de cada una de las muestras en el centro de cada una de las placas previamente identificadas.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico por el lado liso hacia arriba, cubriendo el inóculo, y esperando dos minutos hasta que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas en la estufa a 37,5°C por 48 horas.
- Luego se procedió a observar si existe crecimiento de UFC/ml en las placas cultivadas; si hay presencia de colonias se presentaran de color rojo con presencia de gas.

- Se realizó el reporte de las UFC/ml, teniendo en cuenta la dilución aplicada.
- Hongos y levaduras (UPC/ml)

Para las levaduras y mohos se tomaron muestras de 72 horas; el método consistió en:

- Se preparó la muestra y las diluciones de las bebidas ( $10^{-3}$ )
- Se colocó la placa Petrifilm™ Levaduras y Mohos 3M en la Cabina de Flujo Laminar y se levantó la película superior.
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó 1ml de cada una de las muestras en el centro de cada una de las placas previamente identificadas.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico por el lado liso sobre la lámina superior, cubriendo el inoculo, y esperando dos minutos hasta que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas en la estufa a 25°C por 48 horas.
- Luego se procedió a observar si existe crecimiento de UPC/ml en las placas cultivadas; si hay presencia de levaduras se presentan como puntos definidos de color azul – verdoso.
- Se realizó el reporte de las UPC/ml, teniendo en cuenta la dilución aplicada.

#### 2.7.7.4 Evaluación bioquímica

- pH (pH)

Para la determinación del pH se utilizó el potenciómetro a las 72 horas:

- Se encendió el potenciómetro y se colocó el sensor en una solución buffer de pH 4 para que se calibre.
- Se homogenizó la muestra con agitación previamente y se procedió a medirlo para proceder a su anotación.

- Acidez total (mg/l)

Para el análisis de acidez total se toma una alícuota de 10 ml de la bebida y se coloca en un matraz con 15 ml de agua destilada. Luego se somete a ebullición la muestra durante un minuto, para eliminar el dióxido de carbono; en el momento de que se encuentra fría se procede a valorar la acidez.

### *Medición de acidez*

- Se llena una bureta de 25 ml con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N valorada y se toma en cuenta la lectura de la cantidad de solución en la bureta.
  - La muestra en forma de solución se pone en un matraz Erlenmeyer y se adicionan 5 gotas de fenoftaleína al 1% como indicador.
  - Se procede a titular adicionando gota por gota la solución de hidróxido de sodio, al mismo tiempo que se gira lentamente el matraz Erlenmeyer con muestra. Cuando aparece el color rosa se cierra la llave de la bureta y se sigue girando el frasco durante 15 segundos para ver si el color permanece; sino, se adiciona cada vez una gota extra de hidróxido de sodio, si el color permanece, se da por terminada la titulación.
  - Se toma la lectura en la bureta y se calcula la cantidad de hidróxido de sodio que se gasta en la neutralización de la acidez de la muestra.
  - Luego se procede a calcular la acidez presente en la muestra mediante la siguiente fórmula:  
$$\text{mg/l ácido láctico} = \text{Vol. Consumido (hidróxido)} * N (\text{hidróxido}) * \text{PM}(\text{ácido láctico}) * 1000 / \text{Vol. muestra}$$
  - Se expresa como mg/l del ácido predominante en la muestra, ya sea ácido cítrico, málico, láctico, etc.
- Grados brix (°Bx)

Los grados Brix se determinaron a las 72 horas de la siguiente manera:

- Se homogenizó la bebida y se tomó una muestra del centro del recipiente con la ayuda de una pipeta Pasteur.
  - Se colocó una gota en el refractómetro y se realizó la lectura en la escala para proceder a su anotación.
- Azúcares reductores (%)

Para analizar azúcares reductores se procede de la siguiente manera:

### *Preparación de soluciones:*

- Solución de Carrez I. Se disuelve 106 g solución de  $K_4 (Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O$  (hexacianoferrato (II) de potasio) en agua destilada y aforar a 1000 ml.

- Solución de Carrez II. Se disuelve 230 g de acetato de Zn en agua destilada y aforar a 1000 ml (también se puede usar sulfato de Zn al 30%).
- Reactivo de Fheling A. Se disuelve 34,64 g de sulfato de cobre pentahidratado en 500 ml de agua destilada.
- Reactivo de Fheling B. Se disuelve 176 g de tartrato de sodio y potasio y 77 g de sodio hidróxido en 500 ml de agua destilada.
- Los dos reactivos deben guardarse en frascos oscuros.
- Solución de 2,6-diclorofenolindofenol. Pesar 200 mg de 2,6-diclorofenolindofenol en un vaso de 100 ml, mezclar con 80 ml de agua destilada y calentar a 50 °C agitando constantemente. Enfriar y trasvasar cuantitativamente a un balón volumétrico de 500 ml y aforar, guardar en frasco oscuro y en refrigeración. Se estandariza con solución patrón de ácido ascórbico que se prepara pesando 20 mg y colocando en balón volumétrico de 100 ml y disolviendo y aforando con ácido oxálico al 2%; 1 ml de esta solución patrón es igual a 0,2 mg de vitamina C.
- *Para establecer el título de la sol. de 2,6-diclorofenolindofenol se pipetea 0,2 ml de la solución patrón de ácido ascórbico en un Erlenmeyer de 250 ml que contiene 10-30 ml de ácido oxálico al 2% y se valora con la sol. de 2,6-diclorofenolindofenol hasta que aparezca un color rosa. Se debe realizar esto por triplicado y compararse con un blanco. El título se calcula de acuerdo con:*

$$F \text{ (mg de Vit. C/mL DI)} = A / (a - b)$$

En donde:

F = título del 2,6-diclorofenolindofenol (DI).

A = Vit. C añadido en mg por 0.2 ml de disolución patrón de ácido ascórbico o vit. C.

a = ml de DI en la titulación de la solución patrón.

b = ml de DI en la titulación del blanco.

- Solución indicadora de almidón soluble. Pesar 1g de almidón soluble, colocar en un tubo con 10mL de agua destilada y verter sobre un vaso conteniendo 100 ml de agua destilada hirviendo, agitar y hacer hervir por 2 minutos, enfriar y utilizar. Conservar en refrigeración.
- Solución indicadora de alumbre férrico. Sulfato amónico férrico al 10% en agua destilada y añadir ácido nítrico al 10% hasta clarificación de la solución.

#### *Preparación de las muestras:*

- Pesar 5 g de muestra previamente preparada (desmuestra) y luego realizar el desmuestra y trasvasar cuantitativamente con ayuda de agua destilada o el solvente indicado para la

extracción del analito que se quiere dosificar a un balón volumétrico de 250 ml y añadir 100 ml de agua destilada.

- Adicionar 15 ml de solución de Carrez I y 15 ml de solución de Carrez II, agitando después de cada adición.
- Aforar a 250 ml con agua destilada y filtrar por filtro de pliegues.
- El filtrado colocar en una bureta de 50 ml.
- En un Erlenmeyer de 250 ml colocar 5 ml de sol. de Fheling A y 5 ml de sol. de Fehling B.
- Mezclar y añadir 40 ml de agua destilada, colocar núcleos de ebullición y llevar hasta ebullición.
- En este momento y controlando el tiempo con un cronómetro empezar a añadir lentamente cada 2 segundos y en pequeña cantidad de 0,5 ml la solución problema desde la bureta, sin dejar de hervir.
- A 1 minuto y 55 segundos de ebullición adicionar 3 gotas de sol. indicadora de azul de metileno al 1% y continuar la titulación a ritmo de 0,1 ml por segundo hasta color rojo brillante.
- Repetir la titulación adicionando de una sola vez el volumen gastado inicialmente en la titulación anterior, menos 0,5 ml.
- Titular a ritmo de 0,5 ml cada 10 segundos.

#### *Cálculo:*

El % de azúcares reductores se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\%AR = (A \times a \times 100) / (W \times V)$$

En donde:

%AR = porcentaje de azúcares reductores.

A = aforo de la muestra.

a = Título de Fehling (10 cm<sup>3</sup> de solución de Fheling es igual a 0,05 g de glucosa).

W = peso de muestra en g.

V = volumen de la solución problema gastado en la titulación.

- Ácido láctico (ml/l)

#### *Preparación de la fase móvil:*

- Se preparó la fase móvil mezclando agua bi-destilada grado HPLC y ácido fosfórico 0.05 M.
- Luego se procedió a agitar y filtrar con la ayuda de un Kitazato y una bomba de vacío.

- Se desgasificó la fase móvil en un baño de ultrasonido y se colocó en un frasco estéril y ámbar para su posterior uso.

*Determinación de condiciones del HPLC:*

Las muestras se analizaron en un equipo Shimadzu LC-10Ai con autoinyector, con una columna C18 de 15 centímetros, las condiciones del HPLC con las que se aplicó el análisis fueron las siguientes:

- Flujo de inyección: 0.6 ml/min.
- Temperatura: 29°C.
- Fase móvil: Ácido Fosfórico 0.05 M a un pH 2.5.
- Detector UV: onda de 210 nm.
- Concentración del estándar de 50 ppm.

*Preparación del estándar:*

- El estándar de ácido láctico se diluyó en la fase móvil a una concentración de 50 ppm.
- Luego fueron filtradas con un acrodisco de 0.4 µm.

*Preparación de las muestras:*

- La muestra para determinar este ácido orgánico se preparó según (Identificación y cuantificación por HPLC de los ácidos orgánicos mayoritarios en frutas, 1990) para esto se coloca 1ml de muestra y se afora a 10 ml de ácido fosfórico 0.05M.
- La muestra diluida fue filtrada con papel filtro No. 542 y filtrada nuevamente por un acrodisco de 0.4 µm para ser analizada por el HPLC.

*Análisis en el HPLC:*

- Se encendió el equipo y se esperó hasta que se adapte a los parámetros antes mencionados.
- Se corrió el estándar y posteriormente las muestras colocadas en viales para HPLC se llevó a las cedillas del equipo para el análisis.

*Interpretación de los resultados:*

- Una vez corridas las muestras el HPLC se analiza de acuerdo a los tiempos de retención, cada uno de los picos de las muestras comparando con el estándar y así podemos calcular las áreas de cada uno y con ello su cantidad.

*2.7.7.5 Evaluación organoléptica*

- Color, Sabor, Olor (sensorial)

La evaluación organoléptica de la bebida se realizó conforme a un análisis afectivo sensorial de la bebida que consistió en lo siguiente:

- Se preparó un panel de catación para juzgar 5 bebidas conforme a los tratamientos realizados.
- Se procedió mediante el uso de una encuesta a la valoración de las muestras según las variables color, sabor y olor; las muestras fueron codificadas según la tabla de números aleatorios para análisis sensorial según (Andalzuza, 1994).
  - Para calificar en la encuesta conforme a las tres variables de cada muestra se dió los valores de 5 Muy fuerte; 4 Fuerte; 3 Normal; 2 Débil y 1 Muy débil.
  - Se realizó la encuesta con 51 jueces al azar.
  - Se requirió de 5 vasos con distinta muestra para cada juez, un vaso de agua pura para enjuague bucal, uno para rechazo de líquido y medio neutralizante (pan integral para que no haya interferencia en la degustación entre muestras de las bebidas de cada juez.
  - Luego se diseñó una base de datos conforme a la calificación de cada juez.
  - Se realizó conforme la base de datos una tabla de contingencia para saber cuáles son las bebidas más aceptables según las variables analizadas y así ver la mejor.

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Identificación del sustrato azucarado más adecuado para la elaboración de la bebida y producción de biomasa con microorganismos tibetanos.

Se realizó la selección del mejor sustrato con la utilización de 5 productos azucarados en bebidas como son: melaza, panela, azúcar blanca, azúcar morena y jugo de caña de azúcar en a las 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 80, 120, 144 horas mediante fermentación sumergida con microorganismos tibetanos conforme al incremento de biomasa.

**Tabla 1-3.** Cantidad de biomasa producida en función del sustrato utilizado.

SUSTRATOS	Niveles	Biomasa Producida a partir de 90 g en 144 h
	MELAZA 20	99,6
	MELAZA 40	101,88
	PANELA 20	104,06
	PANELA 40	117,36
	AZUCAR B 20	102,78
	AZUCAR B 40	113,02
	AZUCAR M 20	100,92
	AZUCAR M 40	115,32
	J CAÑA 20	92,72
	J CAÑA 40	97,2

Fuente: (Paucar Barreno, 2015)

Así conforme los resultados obtenidos en las pruebas con la panela se obtuvo la mayor producción de biomasa para la caracterización de la bebida y biomasa para alimentación animal mediante fermentación sumergida con microorganismos tibetanos; así también fue notable ver el antagonismo que la biomasa y los microorganismos tiene en presencia de melaza ya que el polisacárido estructural se fragmenta y no hay mayor producción de biomasa útil.

Los insumos utilizados para la producción de biomasa compuesta por microorganismos tibetanos son sumamente accesibles y baratos ya que solamente necesitamos un sustrato azucarado como es

la panela. En el mercado ecuatoriano la panela cuesta 1,10 dolares aproximadamente el kilogramo más la adición de una porción pequeña de biomasa que aporta las cepas microbianas y agua pura; así con ello podemos producir en corto tiempo biomasa en cantidad para utilizarla en alimentación animal.

Según (Díaz Garcés et al., 2015) para producir de forma doméstica, el mayor rendimiento de biomasa del kéfir de agua a partir de sustratos azucarados de relativo bajo costo de la industria azucarera pueden ser (piloncillo, panela, melaza, melado, mascabado, azúcar morena y azúcar blanca) y el jugo de betabel, tuna y piña.

### 3.1.1 *Análisis de la vida de anaquel de la bebida nutritiva elaborada con microorganismos tibetanos.*

Se realizó el análisis tomando como referencia dos bebidas fermentadas hasta 72 horas con dos diferentes sustratos utilizados anteriormente repartidos en envases de 40 ml; separados la mitad pasteurizadas y otra sin pasteurizar. Se midió niveles de pH y se hizo un cultivo en placas petrifilm por semana durante 4 semanas consecutivas; para medir el crecimiento microbiano y así ver el tiempo de duración que tiene la bebida para el consumo de forma segura.

**Tabla 2-3.** Evaluación de vida de anaquel para ver el tiempo de conservación de la bebida pasteurizado y sin pasteurizar.

	VIDA DE ANAQUEL	pH	COLIFORMES
1 SEMANA	TP-ambiente	2,5	
	TP-pasteurizado	3,1	
	TAM-ambiente	2,5	X
	TAM-pasteurizado	3,1	
2 SEMANA	TP-ambiente	2,1	
	TP-pasteurizado	3	
	TAM-ambiente	2,1	
	TAM-pasteurizado	3,1	
3 SEMANA	TP-ambiente	2	X
	TP-pasteurizado	3,3	
	TAM-ambiente	1,7	X
	TAM-pasteurizado	3,4	
4 SEMANA	TP-ambiente	2,1	X
	TP-pasteurizado	3,1	
	TAM-ambiente	1,9	
	TAM-pasteurizado	3,4	

Fuente: (Pauca Barreno, 2015)

Así con estos datos podemos darnos cuenta que la bebida que contiene panela y se pasteurizó se conserva más que la otra y sus características permanecen estables en promedio de pH de 3.18 y sin contaminación ya que no hay crecimiento de coliformes.

Según (Giraldo Gómez, 1999) los microorganismos causantes de deterioro en los alimentos depende de las condiciones que lo rodean; algunos microorganismos necesitan una fuente de nitrógeno orgánico tal como aminoácidos, mientras que otros se desarrollan solo si hay suficiente glucosa. La actividad del agua también es un factor determinante en el crecimiento microbiano, lo mismo que el pH; en el rango de temperatura y el oxígeno del medio influyen en el crecimiento microbiano.

Así conforme los resultados que se obtuvieron la bebida pasteurizada que contiene panela presenta mayor tiempo de conservación así conservando intactas sus características tanto nutricionales como organolépticas.

### **3.2 CARACTERIZACIÓN DE UNA BEBIDA Y BIOMASA PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL MEDIANTE FERMENTACIÓN SUMERGIDA CON MICROORGANISMOS TIBETANOS**

#### **3.2.1 Evaluación física:**

- Temperatura (°C)

La temperatura no presentó variaciones a las 72 horas de la evaluación, es así que la temperatura de todos los tratamientos fue en promedio de 20,2 °C, fueron expuestas a temperatura ambiental 14,20 °C a las 0 horas.

En múltiples técnicas de biotecnología y microbiología la temperatura es uno de los parámetros ambientales fundamentales ya que determina el crecimiento y conservación de los microorganismos. La temperatura determina la velocidad de crecimiento. (Ramírez et al., 2006: pp.56-71)

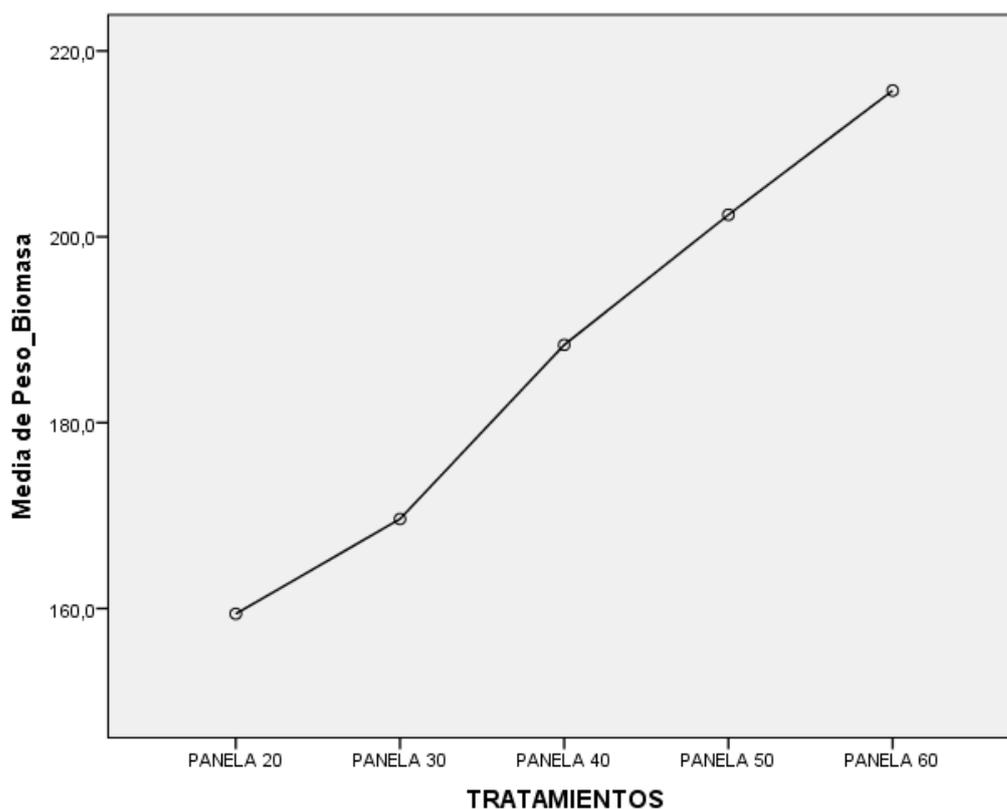
La fermentación aerobia se caracteriza por una reacción de síntesis o asimilación, que consiste en aprovechar los elementos nutritivos de materia orgánica convirtiéndose en sustratos para los microorganismos. En este proceso se produce un rápido aumento de la temperatura que representa la retención de calor producido por la explosión del crecimiento microbiano que degrada los

sustratos simples contenidos en la materia orgánica, estimulando el crecimiento de la microflora mesófila. (Hernández et al., 2003)

Cuando reduce la actividad microbiana se pierde más calor del sistema del que se genera. El material se enfría y llega a estabilizarse. (Enciclopedia Medioambiental, 2016)

- Biomasa

La biomasa que corresponde al polisacárido formado por microorganismos tibetanos y puesta al inicio de la investigación tuvo respectivamente según los tratamientos 100 g y al finalizar la investigación a las 72 horas se obtuvo un incremento donde se reportó un promedio en los tratamientos respectivamente 159.4 g, 169.6 g, 188.3 g, 202.3 g, 215.7 g y se demostró diferencias con el análisis anova entre los tratamientos.



**Gráfico 1-3.** Evaluación de la cantidad de biomasa producida al finalizar la fermentación sumergida.

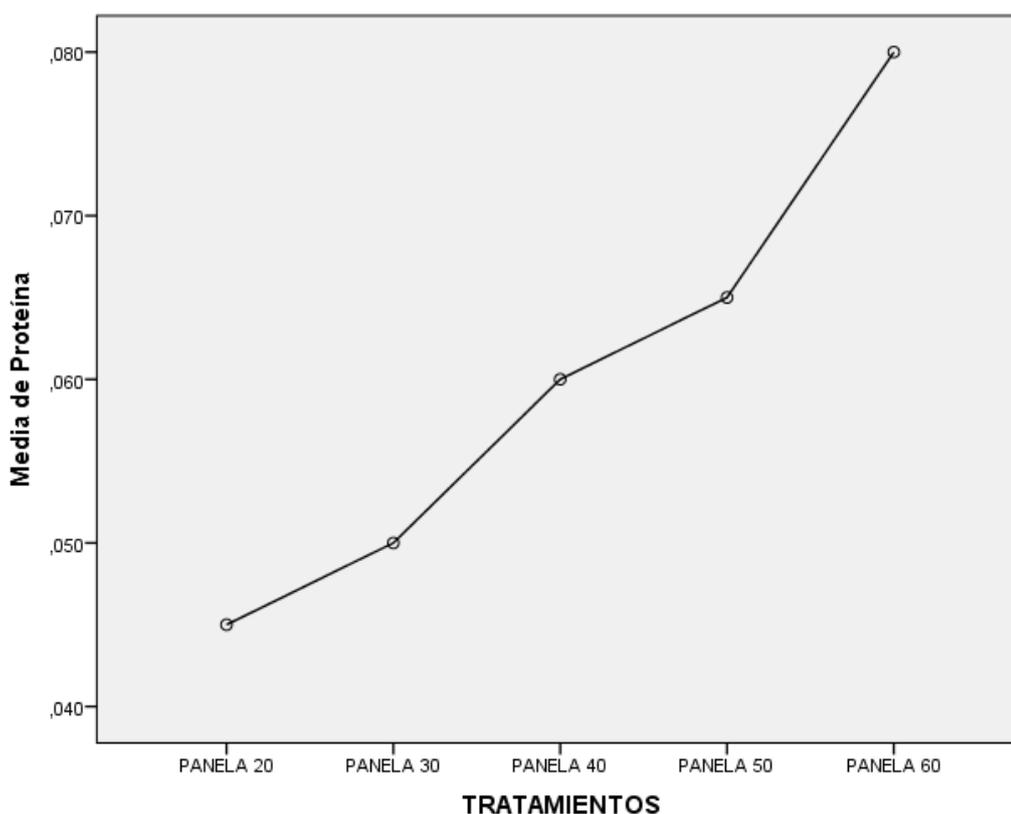
**Realizado por:** (Pauca Barreno, 2015)

Para producir mayor cantidad de biomasa para alimentación animal el tratamiento 5 es el adecuado ya que la producción de biomasa es directamente proporcional al nivel de sustrato en los tratamientos que se analizaron. El valor reportado por (Harta et al., 2004: pp.237-242) en el que obtuvo 27.25 g en 24 h es bajo conforme la actual investigación que presenta 38.56 g en la biomasa producida en 24h de fermentación de forma proporcional.

### 3.2.2 Evaluación bromatológica:

- Proteína (%)

Al evaluar el contenido de proteína de las bebidas a las 72 horas que corresponden a los 5 tratamientos dio como promedio respectivamente 0.045%, 0.050%, 0.060%, 0.065%, 0.080% con diferencias significativas entre los tratamientos siendo el tratamiento 5 el que posee mayor porcentaje de proteína.



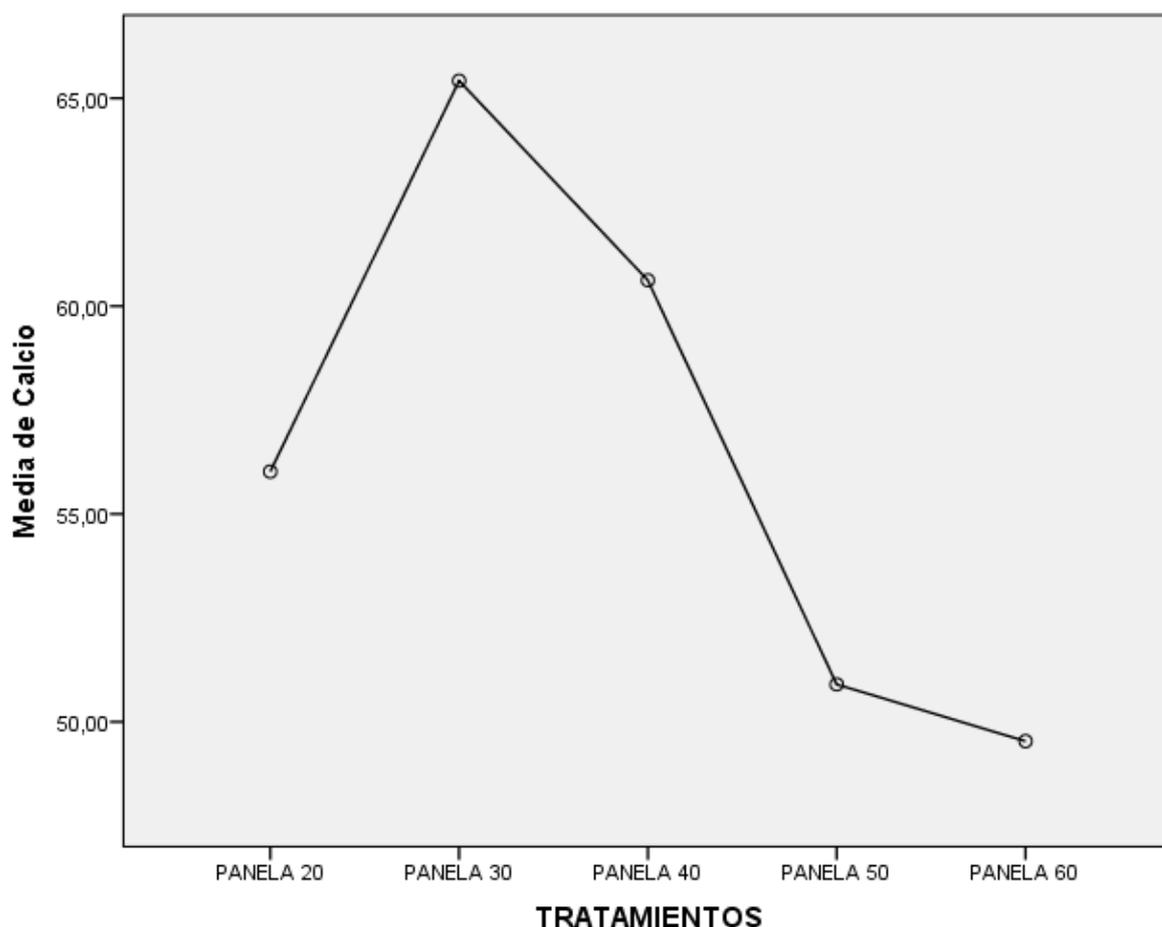
**Gráfico 2-3.** Evaluación de proteína resultante en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.

Elaborado por: (Paucar Barreno, 2015)

Si comparamos la investigación hecha por (Carlosama Chamorro, 2009), la panela como sustrato presenta el 0.46 - 0.74% de proteína en contenido nutricional y esto sería mayor a lo producido en la investigación. Así conforme los resultados hubo una disminución de proteína en las bebidas teniendo en cuenta el nivel de sustrato.

- Calcio (ppm)

Al evaluar el contenido de calcio en las bebidas a las 72 horas que corresponden a los 5 tratamientos se obtuvo como promedio respectivamente, 56.02 mg/l, 65.42 mg/l, mg/l, 60.62 mg/l, 50.90 mg/l, 49.53 mg/l con el análisis anova, siendo el tratamiento 2 el que posee mayor concentración de calcio. Si comparamos la investigación hecha por (Carlosama Chamorro, 2009), la panela como sustrato presenta 1.72 mg de calcio por cada gramo de panela, por lo tanto esto sería menor a lo que se obtuvo en la presente investigación.



**Gráfico 3-3.** Evaluación de calcio resultante en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.

Elaborado por: (Paucar Barreno, 2015)

También si se considera los límites de consumo tolerable con respecto al calcio según la norma (NTE INEN 2983, 2015) indica que no debe superar los 2500 mg por alimento, así según este límite ninguna de las bebidas que corresponden a los 5 tratamientos excede ese límite.

- Fósforo (ppm)

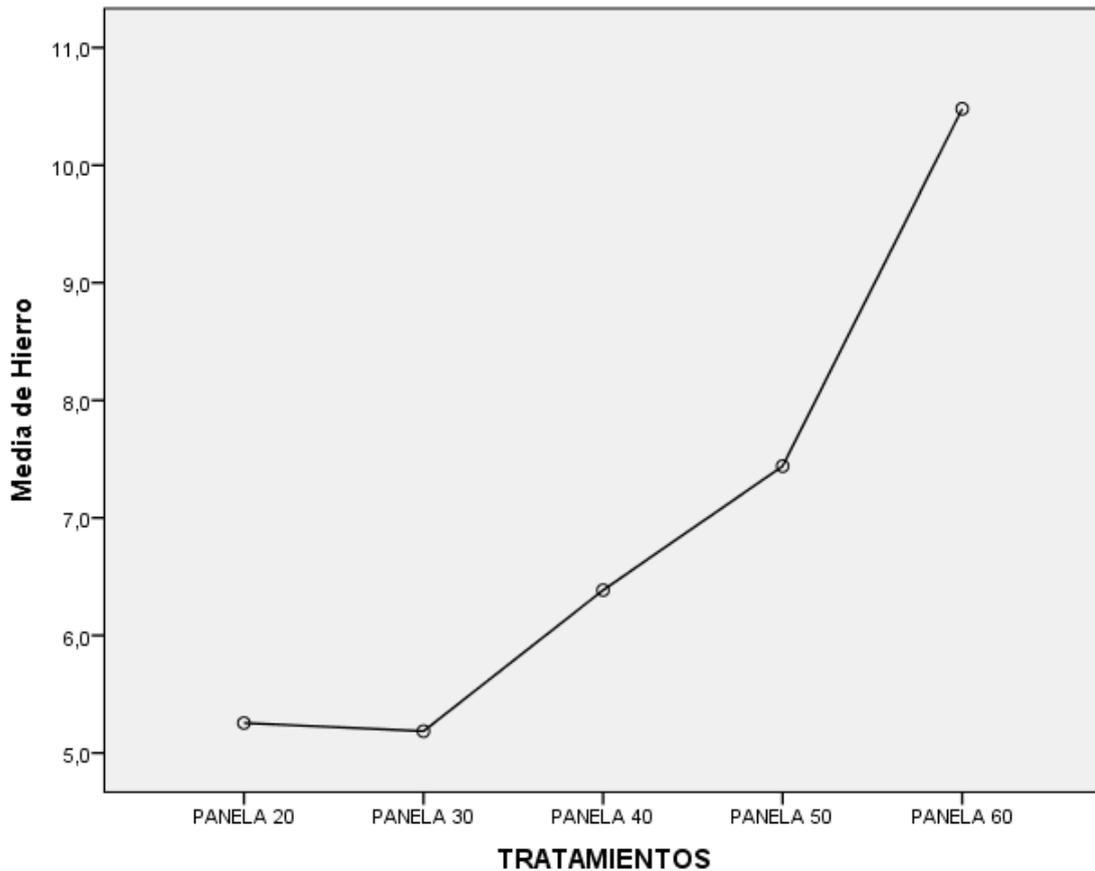
Al evaluar el fosforo en las bebidas a las 72h que corresponden a los 5 tratamientos se obtuvo como promedio, 1 mg/l en los 5 tratamientos. Si comparamos la investigación hecha por (Carlosama Chamorro, 2009), la panela como sustrato presenta 0.60 mg de calcio por cada gramo de panela, esto sería mayor a lo que se obtuvo en la investigación.

También si se considera los límites de consumo tolerable con respecto al fósforo según la norma (NTE INEN 2983, 2015) indica que no debe superar los 250 mg por alimento, así según este límite ninguna de las bebidas que corresponden a los 5 tratamientos excede ese límite.

- Microelementos: Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc (ppm)

Al evaluar el hierro en las bebidas a las 72 horas que corresponden a los 5 tratamientos se obtuvo como promedio respectivamente, 5.25 mg/l, 5.18 mg/l, 6.38 mg/l, 7.44 mg/l, 10.48 mg/l con diferencias significativas entre los tratamientos siendo el tratamiento 5 el que posee mayor concentración de hierro. Si comparamos la investigación hecha por (Carlosama Chamorro, 2009), la panela como sustrato presenta 0.053 mg de hierro por cada gramo de panela, esto sería menor a lo que se obtuvo en la investigación.

También si se considera los límites de consumo tolerable con respecto al hierro según la norma (NTE INEN 2983, 2015) indica que no debe superar los 17 mg en alimentos, así según este límite ninguna de las bebidas que corresponden a los 5 tratamientos no excede ese límite.



**Gráfico 4-3.** Evaluación de hierro resultante en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.

**Elaborado por:** (Paucar Barreno, 2015)

Al evaluar el manganeso en las bebidas a las 72h que corresponden a los 5 tratamientos se obtuvo como promedio, 0,5 mg/l sin diferencias significativas entre los 5 tratamientos. Si comparamos la investigación hecha por (Carlosama Chamorro, 2009), la panela como sustrato presenta 0,012 mg de calcio por cada gramo de panela, esto sería mayor a lo que se obtuvo en la investigación.

También si se considera los límites de consumo tolerable con respecto al manganeso según la norma (NTE INEN 2983, 2015) indica que no debe superar los 4 mg por alimento, así según este límite ninguna de las bebidas que corresponden a los 5 tratamientos excede ese límite.

Al evaluar el cobre en las bebidas a las 72h que corresponden a los 5 tratamientos se obtuvo como promedio, 0,5 mg/l sin diferencias significativas entre los 5 tratamientos con el análisis anova. Si comparamos la investigación hecha por (Carlosama Chamorro, 2009), la panela como sustrato presenta 0,004 mg de calcio por cada gramo de panela, esto sería menor a lo que se obtuvo en la investigación.

También si se considera los límites de consumo tolerable con respecto al cobre según la norma (NTE INEN 2983, 2015) indica que no debe superar los 10 mg por alimento, así según este límite ninguna de las bebidas que corresponden a los 5 tratamientos excede ese límite.

Al evaluar el zinc en las bebidas a las 72 horas que corresponden a los 5 tratamientos, se obtuvo como promedio respectivamente, 0.3 mg/l, 0.3 mg/l, 0.3mg/l, 0.3 mg/l, 0.5 mg/l sin diferencias significativas entre los 5 tratamientos. Si comparamos la investigación hecha por (Carlosama Chamorro, 2009), la panela como sustrato presenta 0.015 mg de zinc por cada gramo de panela, esto sería mayor a lo que se obtuvo en la investigación.

También si se considera los límites de consumo tolerable con respecto al hierro según la norma (NTE INEN 2983, 2015) indica que no debe superar los 25 mg por alimento, así según este límite ninguna de las bebidas que corresponden a los 5 tratamientos excede ese límite.

#### - Vitamina B6 (mg/100g)

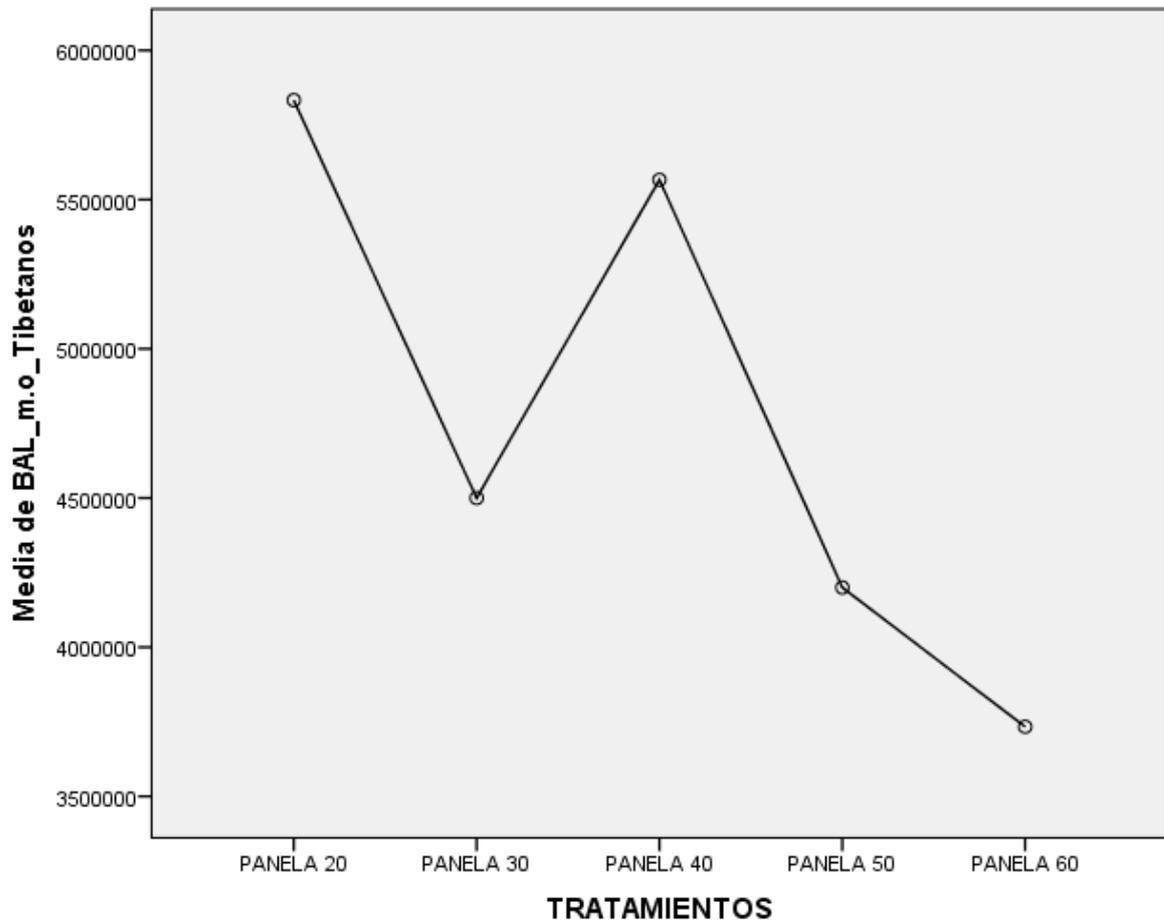
Al evaluar el contenido de vitamina B6 (piridoxina) de las bebidas a las 72 horas que corresponden a los 5 tratamientos dio como resultado 0.2 mg/100g, 0.2 mg/100g, 0.3 mg/100g, 0.3 mg/100g, 0.4 mg/100g para los 5 tratamientos.

Si tomamos en cuenta los límites de consumo tolerable con respecto a la vitamina B6 (piridoxina) según la norma (NTE INEN 2983, 2015) indica que no debe superar los 25 mg por alimento, así según este límite ninguna de las bebidas que corresponden a los 5 tratamientos excede ese límite.

### **3.2.3 Evaluación microbiológica:**

#### - BAL - Microorganismos tibetanos (UFC/ml)

Las Bacterias Acido Lácticas presentaron una gran variación a las 72 horas en el proceso de fermentación para los 5 tratamientos donde se obtuvo respectivamente,  $5.8 \times 10^6$ UFC/ml,  $4.5 \times 10^6$ UFC/ml,  $5.6 \times 10^6$ UFC/ml,  $4.2 \times 10^6$ UFC/ml,  $3.7 \times 10^6$ UFC/ml con el análisis anova, donde el tratamiento 1 presenta mayor número de colonias.



**Gráfico 5-3.** Evaluación de BAL presentes en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.

**Elaborado por:** (Paucar Barreno, 2015).

Si tomamos la referencia según la (NTE INEN 2395, 2011) nos indica que la cantidad de microorganismos específicos dentro de una bebida probiótica sin tratamiento térmico posterior a la fermentación no debe exceder de  $1 \times 10^6$  UFC/ml; es así que los bebidas que corresponden a los tratamientos de la investigación están sobre el límite de la norma vigente. También si comparamos con (Sanz et al., 2003: pp.476-488) (Olagnero et a., 2007: pp.20-33), supera el límite de microorganismos considerados probióticos que es de  $1 \times 10^6$  UFC/ml.

Existen diversos tipos de BAL y estas son bacterias probióticas utilizadas en alimentos y deben ser capaces de sobrevivir al paso por el aparato digestivo y proliferar en el intestino. Son bacterias gram positivas y se utilizan fundamentalmente dos géneros: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Se las conoce como BAL, por su capacidad de convertir los hidratos de carbono en ácido láctico y pueden ser homofermentativas o heterofermentativas. (Olagnero & otros, 2007). Las BAL envuelven a tres géneros tradicionales *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Sin embargo,

se incluye también a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* *Bifidobacterium* y levaduras del género *Saccharomyces*. (Carlosama Chamorro, 2009)

Con la tinción Gram obtuvimos lo siguiente:

**Tabla 3-3.** Resultados de la tinción gram.

Muestra	Bacterias Gram +	Bacterias Gram -
T1	X	0
T2	X	0
T3	X	0
T4	X	0
T5	X	0

**Fuente:** (Paucar Barreno, 2015)

Según la morfología de las bacterias analizadas por la técnica de la tinción Gram se concluye que estas según su forma y características corresponden BAL Gram +. Como indica (Universidad de Granada , 2015) el género *lactobacillus* que se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos; como también *Lactococcus* y *Leuconostoc* que presentan sus células en forma de cocos.

- Clostridium sulfitorreductoras (UFC/ml)

En los resultados que se tuvo conforme el cultivo de muestras en los 5 tratamientos hechos en las bebidas no existen rastros de *Clostridium perfringens* ya que no hay presencia de colonias negras con carácter sulfito - reductor. El *Clostridium perfringens* tiene la capacidad de reducir el sulfito a sulfuro de hierro. (NTE INEN 1 529-18:98, 1998)

Crece rápidamente en medios ricos en carbohidratos en los que produce, mediante la fermentación de éstos, grandes cantidades de hidrógeno y dióxido de carbono, que ayudan a mantener el ambiente anaeróbico con propiedades aerotolerantes. (Alvarado Salinas et al., 2013: pp. 3-5) Posee enterotoxinas que es el principal factor de virulencia de la gangrena gaseosa en humanos y animales provocando intoxicación alimentaria como también la enteritis necrótica de bovinos, equinos y aves. (Morris y Miyakawa, 2009: pp.251-260)

- Coliformes totales y fecales (UFC/ml)

Los resultados que se tuvo conforme el cultivo de muestras en los 5 tratamientos hechos en las bebidas no existen rastros de coliformes totales y fecales en forma de colonias rojas con producción de gas. (Petrifilm™, 2016)

El grupo de microorganismos coliformes son indicadores de calidad, durabilidad e inocuidad en alimentos y son específicos para cada producto alimenticio. Dentro de los indicadores más usados se encuentran los coliformes totales, representados por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Klebsiella* que viven como saprófilos independientes o como bacterias en el tracto gastrointestinal; son anaerobios facultativos no esporulantes, que fermentan lactosa en ácida mixta a 37°C en 48 horas con producción de gas; constituyen aproximadamente el 10% de los microorganismos intestinales de los seres humanos y otros animales. (Jay, 2002)

Una de las bacterias relevantes de este grupo es la *Escherichia coli*, su presencia en los alimentos indica una posible contaminación fecal por lo cual el consumidor en caso de ingerir ese alimento podría estar expuesto a bacterias entéricas referentes al tracto digestivo. (Haller et al., 2009: pp.540-547)

- Hongos y levaduras (UPC/ml)

Los resultados que se tuvo conforme el cultivo de muestras en los 5 tratamientos hechos en las bebidas no existen rastros de mohos (colonias de forma aterciopelada o algodonosa). (Petrifilm™, 2016)

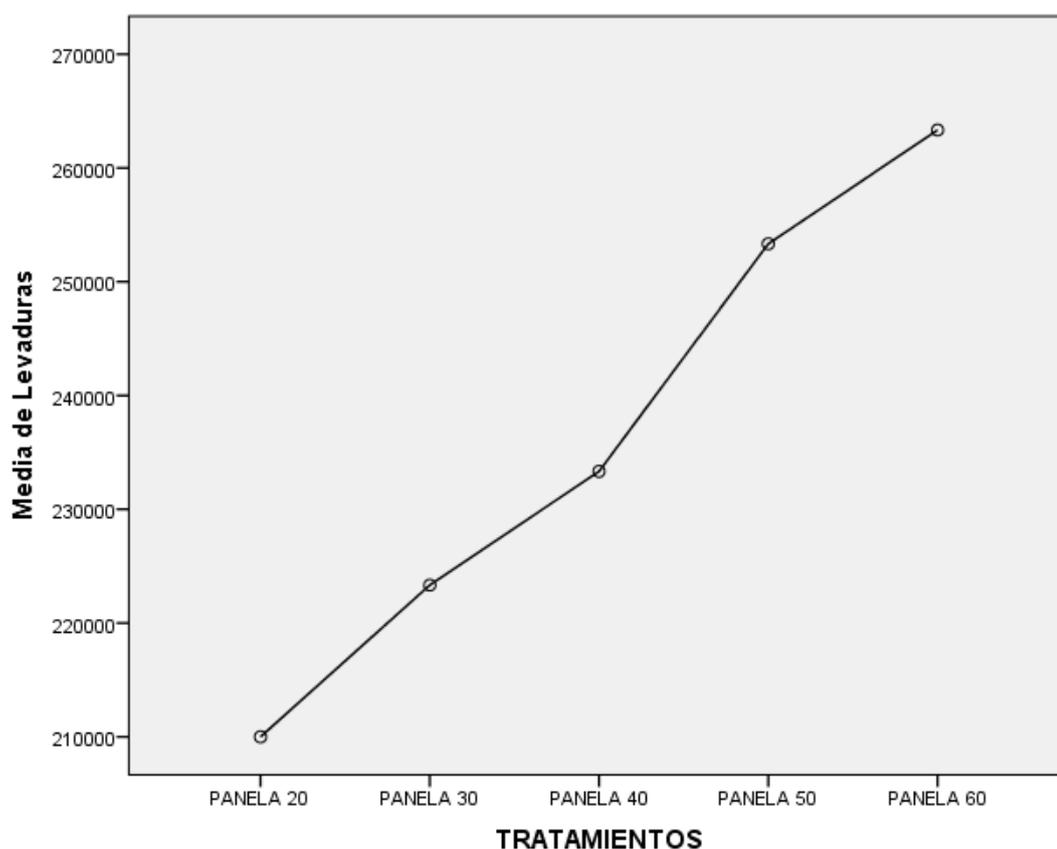
Según la norma (NTE INEN 1 529-11:98 , 1988), los mohos pueden formar, sobre ciertos alimentos, toxinas, llamadas micotoxinas. Provocan la alteración de productos alimenticios, especialmente los ácidos: yogur, jugos, frutas, etc. ó los de presión osmótica elevada, productos deshidratados, jarabes, algunos productos salados, etc.

Los resultados de la investigación conforme a levaduras a las 72 horas en los 5 tratamientos se obtuvieron  $2.1 \times 10^5$  UPC/ml,  $2.2 \times 10^5$  UPC/ml,  $2.3 \times 10^5$  UPC/ml,  $2.5 \times 10^5$  UPC/ml,  $2.6 \times 10^5$  UPC/ml, con el análisis anova.

Si nos referimos a los resultados que se obtuvieron de levaduras según (Carlosama Chamorro, 2009) estos no exceden el  $1.0 \times 10^{10}$  UPC/ml que es el límite recomendado para alimentos probióticos.

Entre las principales especies de levaduras empleadas como probióticos se encuentran las siguientes: *Saccharomyces boulardii* (reconocida como líder), *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces fragilis*. (Pérez Leonard, 2007: pp.35-41)

La levadura predominante en el kefir de agua es *Z. florentina*; todas las especies de levaduras identificadas en el kefir agua son capaces de fermentar glucosa así también la *S. Cerevisiae* que está presente es capaz de convertir sacarosa en los monosacáridos glucosa y fructosa por la enzima invertasa de manera que la células de levadura tienen glucosa como un metabolito libre. (Gulitz et al., 2011: pp.284-288)



**Gráfico 6-3.** Evaluación de levaduras presentes en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.

**Elaborado por:** (Paucar Barreno, 2015)

Las levaduras, al contrario de otros microorganismos con potencial probiótico, tienen una limitada capacidad para colonizar el tracto gastrointestinal de humanos y animales. La especie *S. cerevisiae* solamente es capaz de multiplicarse en el tracto digestivo de ratones. La levadura es drásticamente eliminada del tracto digestivo de ratones normales por efecto antagonista de la flora intestinal, pues su complejo ecosistema microbiano hace a la levadura incapaz de competir. (Castro y Rodríguez, 2005: pp.1-17)

#### 3.2.4 *Evaluación bioquímica:*

- pH (potencial hidrogeno)

Conforme las mediciones de pH al iniciar la investigación fue de 6 - 6.1 en todos los tratamientos y al transcurrir 72 horas de fermentación se obtuvo conforme los 5 tratamientos en promedio respectivamente 3.3, 3.4, 3.4, 3.5, 3.5 sin presentar diferencias.

Según (Hernández et al., 2003) el pH en el crecimiento de los microorganismos varía entre 3,0 y 8,0; en general las bacterias crecen a pH cercanos a 7, con excepción de BAL que resisten pH ácidos. Por otro lado los hongos filamentosos y levaduras prefieren pH ácidos de 5,0. Estas condiciones presentan una ventaja relevante en fermentaciones con hongos, ya que el riesgo de contaminación bacteriana es bajo.

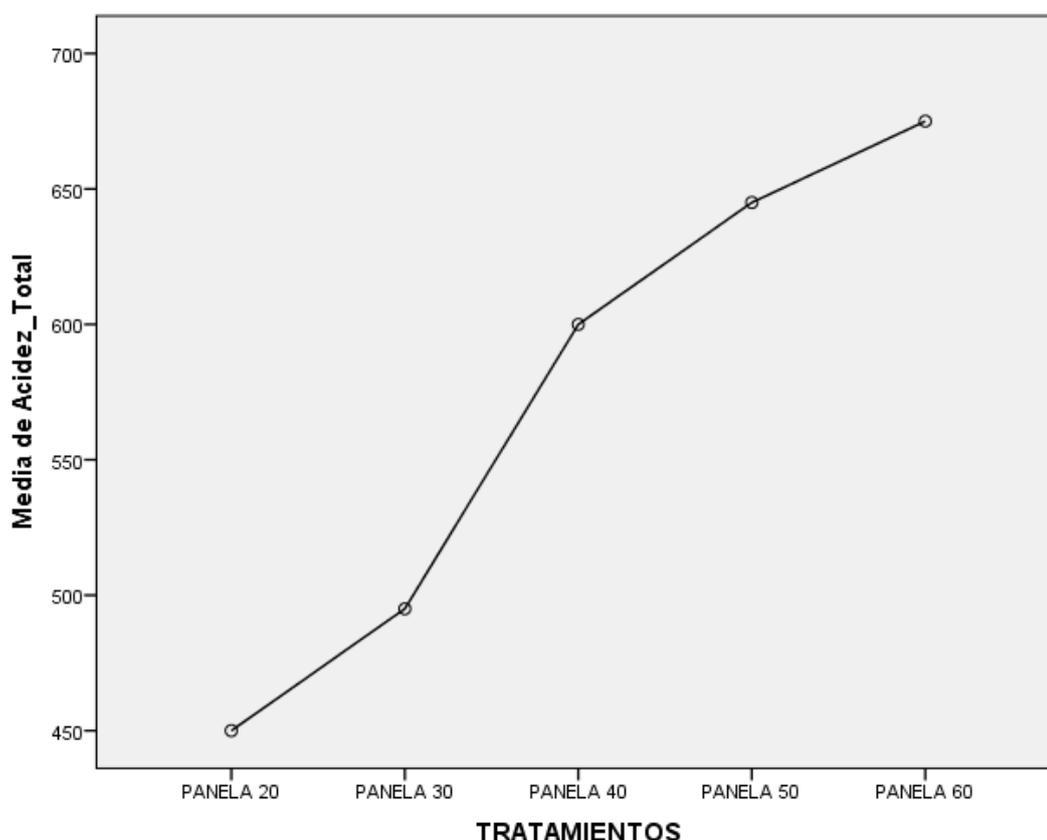
Según (Rodríguez Prado, 2003), el pH es un factor importante en la fermentación ya que determina las condiciones ideales que tienen los microorganismos y así poder controlar cualquier tipo de contaminación bacteriana como también al efecto del crecimiento de levaduras y en la velocidad de fermentación. En el transcurso de la fermentación las levaduras toman nitrógeno de los aminoácidos orgánicos, perdiendo su carácter anfótero y pasando a ácidos, lo cual origina una disminución del pH del medio. Cuanto más bajo el pH del medio es menor el peligro de infección así el mecanismo actúa de carácter directamente proporcional.

Según (Jay, 2002), la mayoría de BAL toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias (algunas pueden crecer a pH 3, 6 y 9).

Así diríamos que la acidez obtenida al final de los 5 tratamientos no permite el crecimiento de bacterias consideradas patógenas (*Clostridium*, *Escherichia*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, entre otras) referido en alimentos para consumo humano. (Carrillo et al., 2007: pp.31-40)

- Acidez total (mg/l)

Al evaluar el contenido los acidez total titulable que se producido en la fermentación podemos resaltar que hubo a las 72 horas conforme a los 5 tratamientos respectivamente valores de 450 mg/l, 495 mg/l, 600 mg/l, 645 mg/l, 675 mg/l expresado en función del ácido láctico por ser el más predominante en la bebida entre los tratamientos. Así también es claro que hay una relación directamente proporcional conforme al nivel de sustrato utilizado ya que el primer tratamiento presenta la acidez más baja conforme a los demás tratamientos.



**Gráfico 7-3.** Evaluación de acidez total presente en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.

**Elaborado por:** (Paucar Barreno, 2015)

Si tomamos como referencia el nivel de acidificación que proporciona el ácido láctico en la estabilización de bebidas de carácter alcohólico estarían los resultados de la investigación por debajo de límite que es de 3.8g/l de ácido láctico (Moscoso Sánchez, 2011) dado que la acidez que se obtuvo conforma una mezcla de distintos ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético y etanol) producidos mediante homofermentación y heterofermentación. (Monar et al., 2014)

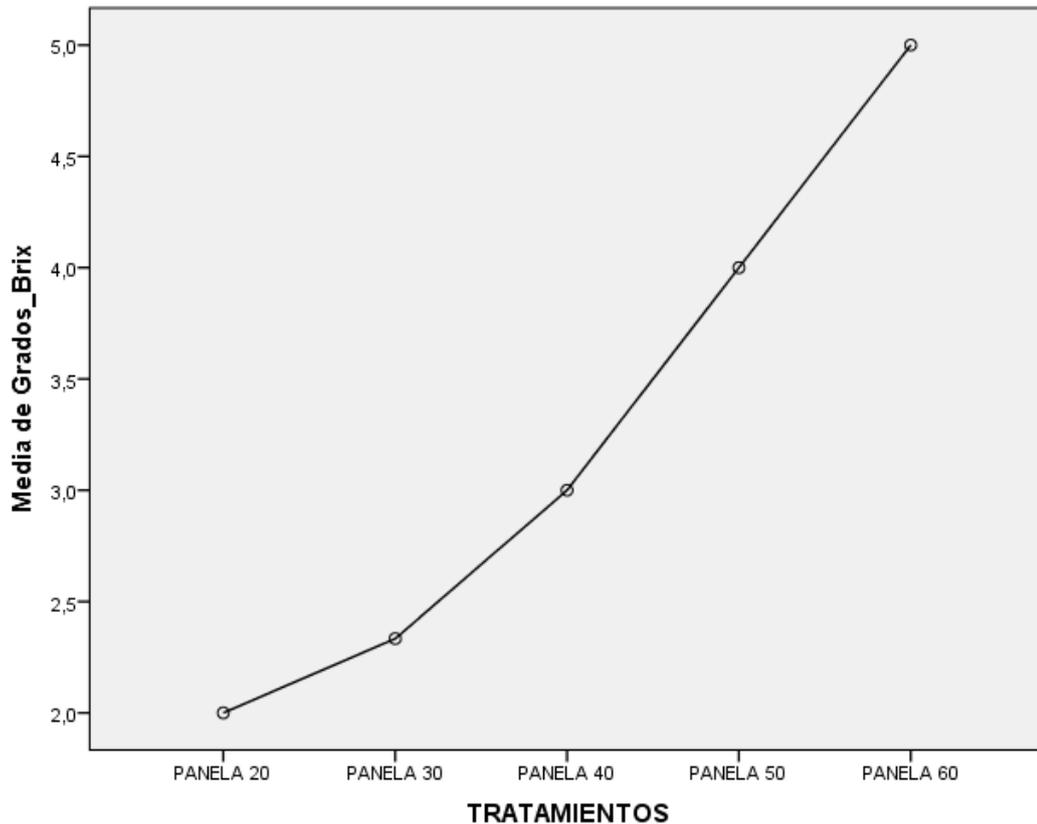
La presencia de ácido láctico es predominante en los tratamientos ya que influyen directamente en su mayoría BAL. La presencia de este ácido en altas concentraciones es beneficiosa ya que actúa como un conservante del producto y evita la proliferación de microorganismos patógenos. (Moscoso Sánchez, 2011)

El género predominante en el kéfir de agua es *Lactobacillus*, que representa el 82,1% en agua; las especies más abundantes son *Lactobacillus hordei* y *Lactobacillus. nagelii* seguido por números considerablemente más bajos de *Lactobacillus Casei* y *Lactobacillus hilgardii*. Otras bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentran como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus. Citreum*. (Gulitz et al., 2011: pp.284-288)

Según (Bylund, 2002), las bacterias ácido lácticas presentan metabolismo productor de energía de carácter fermentativo, formando principalmente ácido láctico a partir de azúcares. Existen de dos tipos: las homofermentadoras que convierten la glucosa en ácido láctico vía Embdem-Mayerhoff por glucólisis, y las heterofermentadoras que la convierten en una mezcla de ácido láctico, etanol, dióxido de carbono y otros productos volátiles mediante la ruta de la pentosa fosfato. La mayor parte de bacterias lácticas forman entre 0,5 y 1,5% de ácido láctico, pero algunas alcanzan niveles del 3%.

- Grados brix (°Bx)

El coeficiente de sacarosa o grados Brix durante las 72 horas se obtuvo en promedio conforme los 5 tratamientos 2° Brix, 2° Brix, 3° Brix, 4° Brix, 5° Brix presentando diferencia muy marcada con intervalos de confianza de 95 %; así debido a la concentración ascendente que presentan los experimentos; así el tratamiento 1 presenta la menor cantidad de solidos solubles en la bebida resultante. Cabe resaltar que este coeficiente no tiene correlación con la temperatura ni el crecimiento microbiano.



**Gráfico 8-3.** Evaluación de grados brix presentes en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.

**Elaborado por:** (Paucar Barreno, 2015)

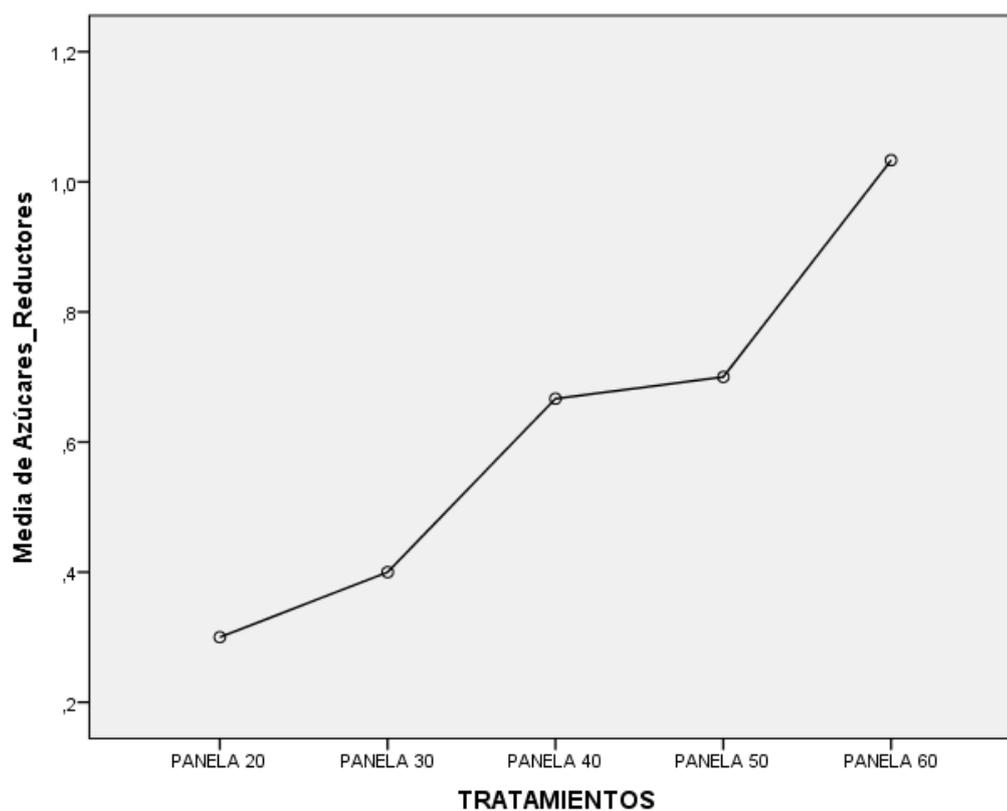
Si comparamos los resultados obtenidos por (Monar, 2013) a las 72 horas de fermentación no excede a los de la presente investigación ya que obtuvo 5.23, 5.40 y 5.57 °Brix siendo los mejores tratamientos.

Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles presentes en un jugo o pulpa expresados en porcentaje de sacarosa. Los sólidos solubles están conformados por los azúcares, ácidos, sales y otros compuestos solubles en agua presentes en los jugos. (Ocampo González, 2000)

Las bacterias presentes en el kéfir de agua utilizan como sustrato glucosa y fructosa como fuente de energía. Según (Texeira et al., 2011: pp.693-702), en su investigación sobre el kéfir de agua se muestra que el contenido de sólidos solubles (grados Brix) se redujo al final de la fermentación, conforme a la concentración de la solución.

- Azúcares reductores (%)

Al evaluar el contenido de azúcares reductores al final de la fermentación se obtuvo conforme a los 5 tratamientos respectivamente valores promedio de 0.3%, 0.4%, 0.66%, 0.7%, 1%, con análisis anova para los tratamientos. Así también es claro la relación directamente proporcional del nivel de sustrato utilizado en cada experimento.



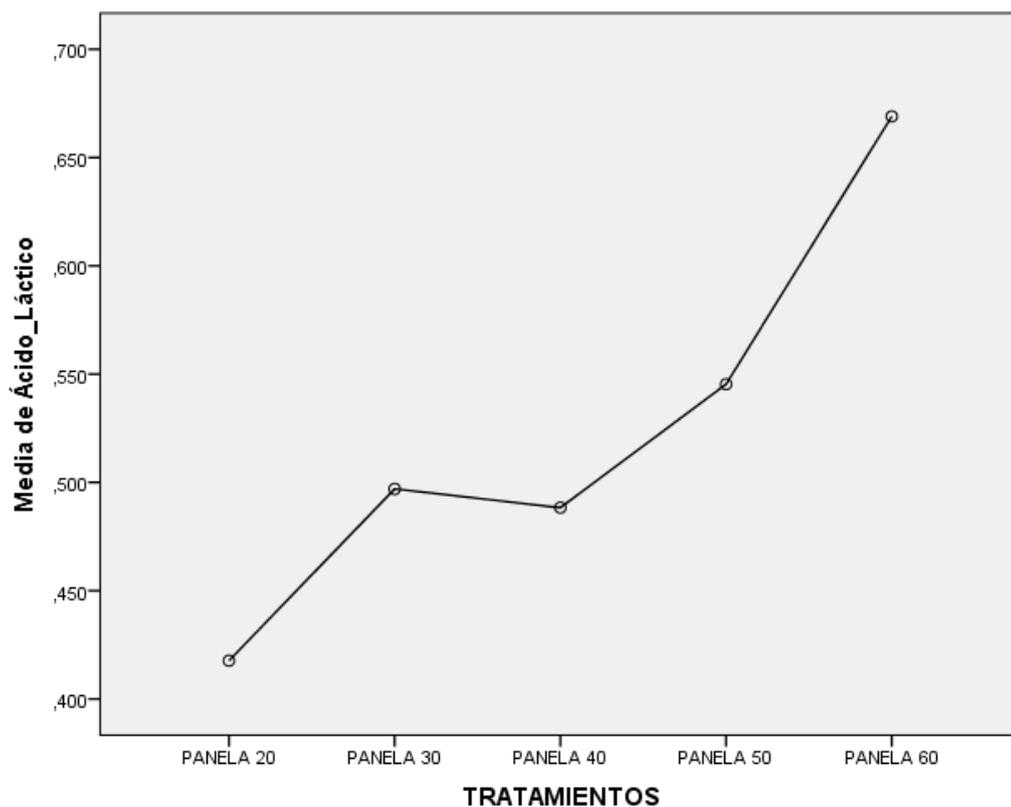
**Gráfico 9-3.** Evaluación de grados azúcares reductores presentes en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.

**Elaborado por:** (Pauca Barreno, 2015)

La fructosa y la glucosa son dos azúcares reductores que pueden ser utilizados para sintetizar alcohol con un proceso de fermentación, además pueden interactuar con las proteínas dando resultado la caramelización o reacciones de Maillard. (González et al., 2007)

- Ácido láctico (ppm)

Al evaluar el contenido los ácido láctico que se produjo en la fermentación podemos resaltar que hubo a las 72 horas conforme a los 5 tratamientos respectivamente valores promedio de 0.41 mg/l, 0.49 mg/l, 0.48 mg/l, 0.54 mg/l, 0.66 mg/l con análisis anova entre los tratamientos. Así también es claro que hay una relación directamente proporcional conforme al nivel de sustrato utilizado; para que se pueda sintetizar el ácido láctico es necesario que haya azúcares reductores o azúcares simples en la bebida. Así la mayor producción de ácido láctico presenta el tratamiento 5 ya que este tiene mayor grado de sustrato.



**Gráfico 10-3.** Evaluación de grados ácido láctico presente en las bebidas al finalizar la fermentación sumergida.

**Elaborado por :** (Pauca Barreno, 2015)

Entonces podemos decir que los resultados obtenidos en el análisis de ácido láctico en esta investigación están por debajo del umbral láctico o umbral anaeróbico requerido de 4 mmol/l que debe tener un deportista en actividad (Clínica MEDS, 2016); así también estas bebidas al poseer

ácido láctico puede ser una alternativa alimenticia para las personas que son intolerantes a la lactosa de la leche.

El ácido láctico o lactato en el cuerpo es una sustancia producida en el interior del organismo humano a través de la oxidación de la glucosa en la célula y afecta de manera significativa en el ejercicio muscular, provocando la aparición de fatiga y dolores musculares tras la realización de un esfuerzo físico. La presencia del ácido láctico o lactato en la sangre significa que en el músculo se ha producido energía sin necesidad de oxígeno, volcándose esta energía en la sangre, para luego eliminarse, también el corazón lo utiliza como combustible. (McArdle et al., 2004)

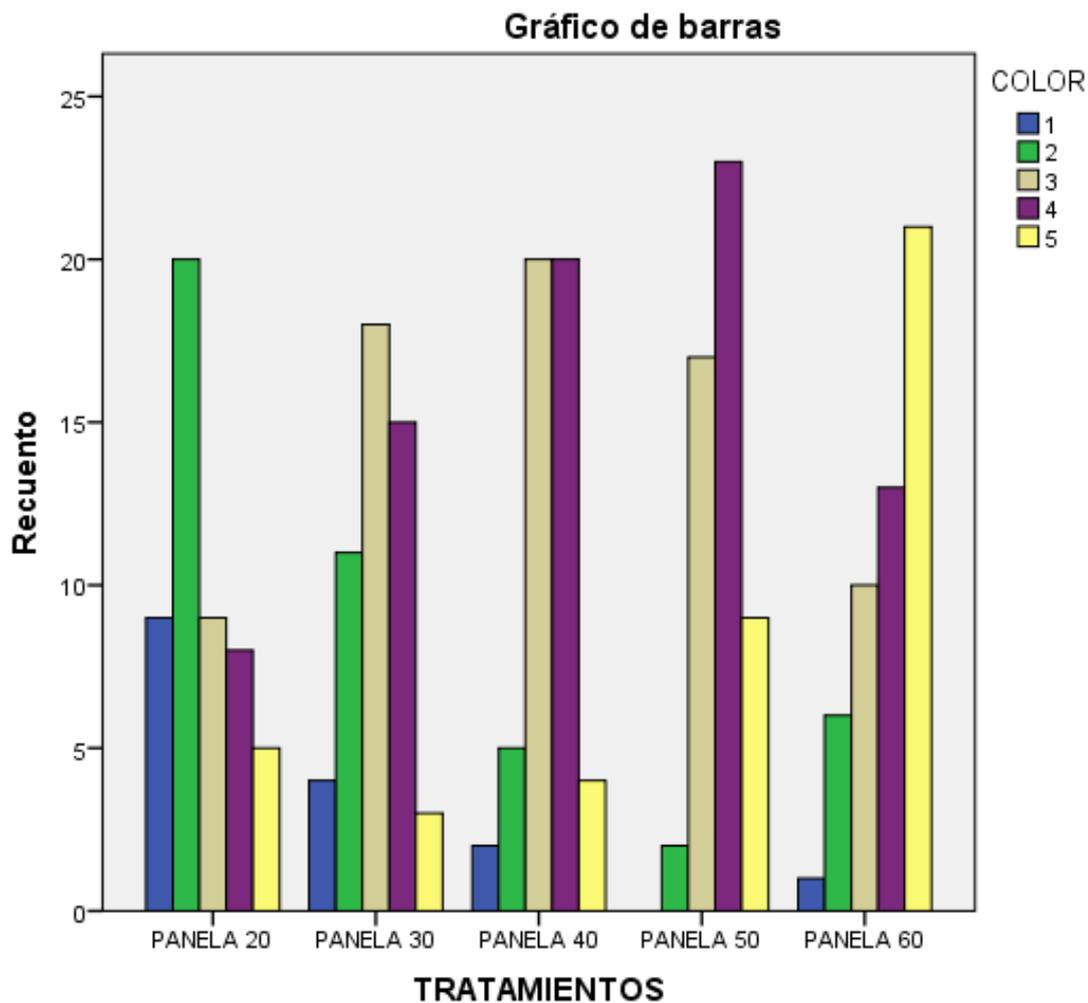
El ácido láctico en la sangre se utiliza como sustrato para recuperar la glucosa (glucogénesis) y como combustible directo para el músculo activo. Así un deportista de élite podría llegar a eliminar todo el ácido láctico producido durante su entrenamiento en apenas siete minutos, ya que el ácido láctico se metaboliza de manera rápida, especialmente en el hígado donde se metaboliza entorno al 60% del ácido láctico producido. (McArdle et al., 2004)

### **3.2.5 Evaluación organoléptica:**

Conforme a la evaluación organoléptica efectuada con la bebida al terminar la fermentación los resultados del análisis sensorial afectivo para los 5 tratamientos en la investigación se encontraron conforme al criterio de los participantes lo siguiente:

- Color

La mayoría de participantes prefirieron el tratamiento 4 con nivel fuerte = 4 en color según el conteo en la encuesta realizada a los participantes. Véase figura 11-3.



**Gráfico 11-3.** Evaluación del color en las bebidas según el análisis afectivo.

Elaborado por: (Paucar Barreno, 2015)

**Color**

**1 = Muy débil**

**2 = Débil**

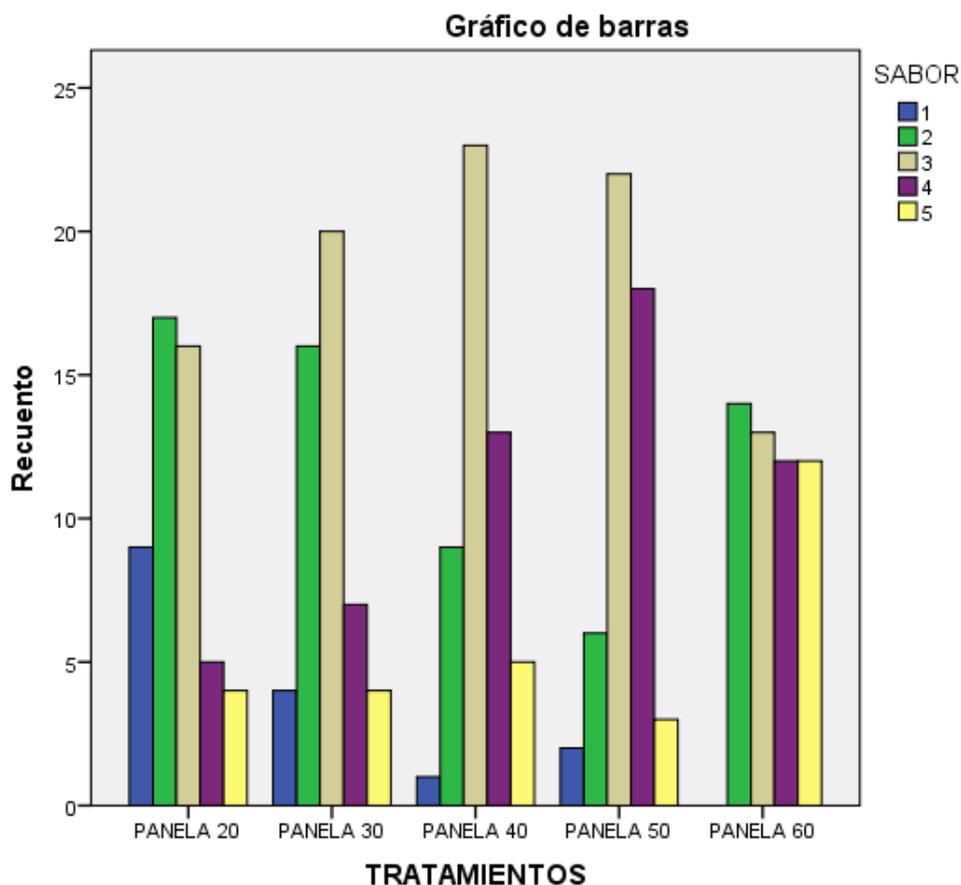
**3 = normal**

**4 = Fuerte**

**5 = Muy fuerte**

- Sabor

La mayoría de participantes prefirieron el tratamiento 3 con nivel normal = 3 en sabor según el conteo en la encuesta realizada a los participantes. Véase figura 12-3.



**Gráfico 12-3.** Evaluación del sabor en las bebidas según el análisis afectivo.

Elaborado por: (Paucar Barreno, 2015).

**Sabor**

**1 = Muy débil**

**2 = Débil**

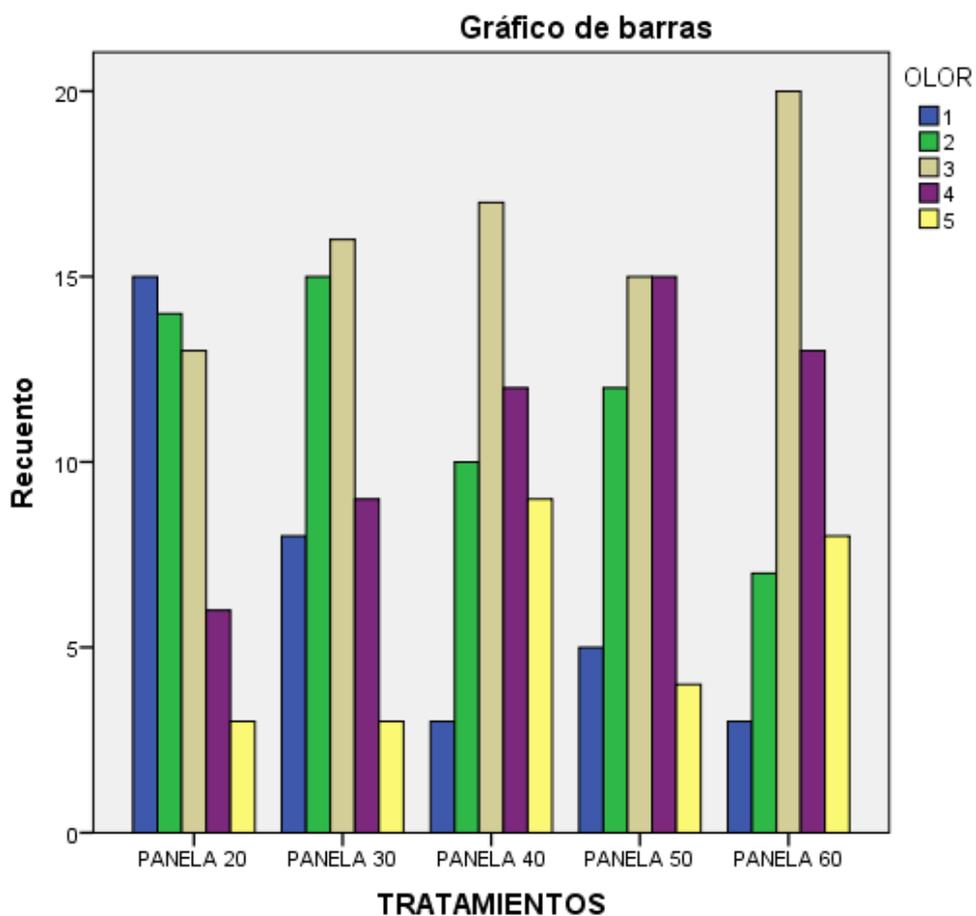
**3 = normal**

**4 = Fuerte**

**5 = Muy fuerte**

- Olor

La mayoría de participantes prefirieron el tratamiento 5 con nivel normal = 3 en olor según el conteo en la encuesta realizada a los participantes. Véase figura 13-3.



**Gráfico 13-3.** Evaluación del olor en las bebidas según en análisis afectivo.

Elaborado por: (Paucar Barreno, 2015)

*Olor*

**1 = Muy débil**

**2 = Débil**

**3 = normal**

**4 = Fuerte**

**5 = Muy fuerte**

La aceptación que hubo al final con respecto a las bebidas según sus atributos dada por los jueces participantes se encuentra en el rango de preferencia de normal - muy bueno conforme a los tratamientos 3, 4 y 5.

## CONCLUSIONES

- Se caracterizó la bebida mediante múltiples análisis de laboratorio, destacando la presencia de ácido láctico predominante y la ausencia de agentes contaminantes; siendo muy significativa la cantidad de sustrato azucarado utilizado rico en nutrientes para la proliferación de microorganismos tibetanos y biomasa; los tratamientos 3, 4 y 5 tienen las mejores características según las pruebas de laboratorio y el análisis afectivo sensorial.
- Se identificó bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas presentes de carácter probiótico con la ayuda del agar MRS (man rogosa sharpe) con valores de  $5.8 \times 10^6$  UFC/ml y de igual forma la presencia de levaduras en cultivos con agar PDA (Potato Dextrose Agar) y placas petrifilm con valores de  $2.6 \times 10^5$  UFC/ml; como parte del grupo de los microorganismos tibetanos que intervienen directamente en la fermentación sumergida y que presentan beneficios como probióticos para la salud humana.
- Se produjo en la bebida hidratante una cantidad máxima de 0.66 mg/l de ácido láctico que es apta para deportistas dado los problemas que existen cuando realizan esfuerzo físico en actividades aeróbicas, ya que el cuerpo de un deportista necesita pequeñas cantidades de ácido láctico para que funcione como una fuente temporal de energía y así cumpla un mejor desempeño.
- Se ha determinado un costo de 0.24 dólares que es relativamente bajo por cada litro para la elaboración de la bebida y producción de biomasa ya que los insumos son baratos y fáciles de adquirir en el mercado; así como los beneficios nutritivos que aportan los insumos de base y los microorganismos presentes de carácter probiótico que inhiben el crecimiento de distintos agentes patógenos en el tracto digestivo en humanos y animales.

## **RECOMENDACIONES**

En función de los resultados alcanzados se puede recomendar:

- Replicar los análisis para identificar los distintos compuestos que se forman mediante la síntesis que pueden ser interés industrial para nuevos productos con distintas características nutricionales y así brindar un fortalecimiento para la salud humana.
- Incluir el análisis de otros ácidos que se producen en el proceso de fermentación sumergida que no fueron analizados y que puedan traer algún beneficio tanto para humanos y animales.
- Realizar análisis microbiológicos a nivel molecular para determinar los microorganismos específicos presentes en la bebida y la biomasa, las cepas de Levaduras y BAL que son las más representativas proyectándose así para formar inóculos en producción de distintos alimentos fermentados.
- Investigar más a fondo sobre la actividad de la bebida frente distintas afecciones y enfermedades que se producen de carácter inmunológico en humanos y animales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Alsayadi, M., Al jawfi, Y., Belarbi, M., & Z Sabri, F.** “Antioxidant Potency of Water Kefir”. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [en línea], (2013), pp. 2444-2447. [Consulta: 25 febrero 2016]. Disponible en: <http://search.proquest.com/openview/c94fb282efc9ac7a278cc8f6707ed6b3/1?pq-origsite=gscholar>
2. **Alvarado, P. A., N., V. M., Saldaña, W. H., & Vargas, A.** “Clostridium perfringens sulfito reductores en hamburguesas que se comercializan en mercados de Trujillo – Perú”. *Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional de Trujillo. Perú* [en línea], (2013). pp. 3-5. [Consulta: 12 octubre 2016]. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbiol/article/view/170>
3. **Andalzua, A.** *Evaluación Sensorial*. [en línea]. Apuntes Científicos. (1994). [Consulta: 2 mayo 2016]. Disponible en: <http://apuntescientificos.org/discriminativas.html>
4. **Argen - Bio.** *Biotecnología tradicional y alimentación*. [en línea]. (Argen - Bio) de Por qué Biotecnología. (2007). [Consulta: 2 febrero 2016]. Disponible en: <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=7>
5. **Ballongue, j.** *Bifidobacteria and probiotic action*. [en línea]. New York: Dekker, Marc: Salminen, S; Wright, A. von. (1993). [Consulta: febrero 2016]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=P0p5\\_uXL9uQC&oi=fnd&pg=PA67&dq=\)+Bifidobacteria+and+probiotic+action.&ots=gNb6ZVXKIk&sig=iYI8tGuyOUohbR3sIFs6\\_s6JSEk#v=onepage&q=\).%20Bifidobacteria%20and%20probiotic%20action.&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=P0p5_uXL9uQC&oi=fnd&pg=PA67&dq=)+Bifidobacteria+and+probiotic+action.&ots=gNb6ZVXKIk&sig=iYI8tGuyOUohbR3sIFs6_s6JSEk#v=onepage&q=).%20Bifidobacteria%20and%20probiotic%20action.&f=false)
6. **Barnett, J., & Karl, E.** “A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism.” *Yeast. Yeast - Wiley InterScience*, 22, (2005). pp. 835–894. [Consulta: 3 diciembre 2015]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.1249/full>
7. **BBC.** *The Probiotics Market: Ingredients, Supplements, Foods*. [en línea]. (2014). BBC. [Consulta: 11 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/probiotics-market-fod035d.html>
8. **Belitz, H., Grosch, W., & Schieberle, P.** *Kohlenhydrate. Lehrbuch der*. [en línea]. (Quinta ed.). Berlin: Springer-Verlag. pp. 26-32. (2001). [Consulta: 15 noviembre 2015]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=jtjvBgAAQBAJ&pg=PA65&lpg=PA65&dq=Kohlenhydrate.+Lehrbuch+der&source=bl&ots=d766ZHWVBX&sig=91cDBJfei8d7StEH5gguubmSbCI&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwilhYiD2MBrAhUELSYKHRlpBbcQ6AEIITAB#v=onepage&q=Kohlenhydrate.%20Lehrbuch%20der&f=false>
9. **Bergmann, R., Pereira, M., Veiga, S., Schneedorf, J., de Mello Silva Oliveira, N., & Fiorini, J.** “Microbial profile of a kefir sample preparations - grains in natura and lyophilized and fermented suspension.” *Food Science and Technology (Campinas)*. [en línea]. (2010), pp. 1022-1026. [Consulta: 3 diciembre 2015]. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612010000400029](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000400029)
10. **BYLUND, G.** *Manual de Industrias Lácteas*. [en línea]. España: Mundi-Prensa. (2002). [Consulta: 6 enero 2016]. Disponible en: [https://www.jica.go.jp/nicaragua/espanol/office/others/c8h0vm000001q4bc-att/14\\_agriculture01.pdf](https://www.jica.go.jp/nicaragua/espanol/office/others/c8h0vm000001q4bc-att/14_agriculture01.pdf)

11. **Carlosama Chamorro, P. F.** Diseño del plan y documentación para la implementación de buenas prácticas de manufactura para la elaboración de panela granulada para las unidades productivas panaleras de la COPROPAP de Pacto. [en línea]. (Tesis de pregrado). ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL. (2009). [Consulta: 12 enero 2016]. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1663/1/CD-2015.pdf>
12. **Carrillo, L., & Audisio, M. C.** *Manual de microbiología de los alimentos* (Primera ed.). (U. S. Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, Ed.) Jujuy, Argentina. [en línea]. (2007). pp. 31-40. [Consulta: 4 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/0%20portada%20manual.pdf>
13. **Casado Sánchez, E., Dúran Barquero, P., & Paredes de la Sal, A. J.** *OPERACIONES BASICAS LABORATORIO GM 12 CF*. En E. Casado Sánchez, P. Dúran Barquero, & A. J. Paredes de la Sal, *OPERACIONES BASICAS LABORATORIO GM 12 CF*. Madrid: Paraninfo.S.A. (2012). pp. 190-192.
14. **Castro, M., & Rodríguez, F.** “Levaduras: Probióticos Y Prebióticos Que Mejoran La Producción Anima"L”. *CORPOICA*, 6(1), [en línea]. (2005). pp. 1-17. [Consulta: 20 diciembre 2015]. Disponible en: [http://soda.ustadistancia.edu.co/enlinea/3momento\\_microbiologia\\_mariabelalcazar/v6n1\\_p26\\_38\\_levaduras\\_proprevioticpdf.pdf](http://soda.ustadistancia.edu.co/enlinea/3momento_microbiologia_mariabelalcazar/v6n1_p26_38_levaduras_proprevioticpdf.pdf)
15. **Cerning, J.** “Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria”. *FEMS Microbiology Reviews*, [en línea]. (1990). pp. 113-130. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: <http://femsre.oxfordjournals.org/content/7/1-2/113.abstract>
16. **Clinica MEDS.** *Umbral de Lactato*. Medicina Deportiva. [en línea]. (2016). [Consulta: 26 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.meds.cl/especialidad/umbral-de-lactato>
17. **Davidović, S. Z., Miljković, M. G., Antonović, D. G., Rajilić-Stojanović, M. D., & Dimitrijević-Branković, S. I.** “Water Kefir Grain as a Source of Potent Dextran Producing Lactic Acid Bacteria”. *Hemijska industrija (HEM IND)*. [en línea]. (2014). pp. 595–604. [Consulta: 9 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0367-598X/2015/0367-598X1400083D.pdf>
18. **De los Reyes, J.** Plan de implementación y desarrollo de buenas prácticas de manufactura en la elaboración de panela granulada y en bloque en la planta panelera Gardenia. (QUITO/EPN/2011, Ed.). [en línea]. Repositorio Digital EPN: (2011). [Consulta: 10 Mayo 2016]. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2738>
19. **De Vuyst, L., & Degeest, B.** “Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria”. *FEMS microbiology reviews - Universiteit Brussel – Belgium*. [en línea]. (1999). pp. 153-177. [Consulta: 4 enero 2016]. Disponible en: <http://femsre.oxfordjournals.org/content/23/2/153.abstract>
20. **Díaz Garcés, J., Díaz Garcés, V., Ulloa, M., & Taboada, J.** *Determination of some parameters for the household production of tìbicos*. [en línea]. Biblioteca Virtual em Saúde: (2015). [Consulta: 21 enero 2016]. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=94120&indexSearch=ID>
21. **Dickinson, J. R., & Kruckeberg, A. L.** Carbohydrate Metabolism. Berlin: In A Querol & G. [en línea]. (2006). pp. 215-217. [Consulta: 22 marzo 2016]. Disponible en: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-28398-0\\_8#page-1](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-28398-0_8#page-1)

22. **Disegni, C.** *Sor Teresa de Calcuta: Su insólita historia con hongos tibetanos*. [en línea]. (Cultura India), de Guioteca: (2012). [Consulta: 14 enero 2016]. Disponible en: <http://www.guioteca.com/cultura-india/madre-teresa-de-calcuta-su-insolita-historia-con-los-hongos-tibetanos/>
23. **Dobson, A., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Ross, P., & Hill, C.** “High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain”. *FEMS Microbiology Letters*, 320. [en línea]. (2011). pp. 56 - 62 . [Consulta: 12 Abril 2016]. Disponible en: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/320/1/56.abstract>
24. **EcuRed.** *Ácido Láctico*. [en línea]. (2016). [Consulta: 1 junio 2016]. Disponible en: [http://www.ecured.cu/%C3%81cido\\_%C3%A1ctico](http://www.ecured.cu/%C3%81cido_%C3%A1ctico)
25. **Enciclopedia Medioambiental.** *MECANISMOS DE LA FERMENTACIÓN AEROBIA*. [en línea]. Suelos y Residuos. (2016). [Consulta: 17 agosto 2016]. Disponible en: [http://www.ambientum.com/enciclopedia\\_medioambiental/suelos/mecanismos\\_fermentacion\\_aerobia.asp](http://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/suelos/mecanismos_fermentacion_aerobia.asp)
26. **Enciclopedia Salud.** *DEFINICIÓN DE FÓSFORO (P3-)*. [en línea]. (2007). [Consulta: 8 abril 2016]. Disponible en: <http://www.enciclopediasalud.com/definiciones/fosforo>
27. **ESPOCH.** Estación Agro meteorológica de la F.R.N. de la ESPOCH. (2014). Riobamba, Chimborazo, Ecuador.
28. **FAO - OMS.** *Probióticos en los alimentos - Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*. [en línea]. Alimentación y Nutrición. (2006). [Consulta: 19 febrero 2016]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>
29. **FAO.** *Crecimiento de la población humana y cambios demográficos*. (DEPÓSITO DE DOCUMENTOS DE LA FAO). [en línea]. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (2001). [Consulta: 16 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/x9601s/x9601s04.htm>
30. **FAO.** *NUTRIENTES ESENCIALES-MINERALES*. Departamento de Pesca. (2016). [Consulta: 4 julio 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/ab492s04.htm>
31. **Fernandez, C. F., González, S. M., & Travieso, L.** *Determinación de vitaminas del Complejo B en Arthrospira maxima por cromatografía líquida de alta resolución* . [en línea]. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. San Lázaro y L. (2001). [Consulta: 6 Marzo 2016]. Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/224.pdf>
32. **Firat, S., Yavuz, B., Cumhur, C., & Derya, O.-D.** “Assessment of Potential Probiotic Properties of Lactobacillus spp., Lactococcus spp., and Pediococcus spp. Strains Isolated from Kefir”. *Journal of Food Science*, 75, [en línea]. ( 2010). pp. 568–573. [Consulta: 11 agosto 2016]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2010.01855.x/full>
33. **Fredrickson, A. G.** “Behavior of mixed cultures of microorganisms”. *Annual reviews of Microbiology*, 31, [en línea]. pp. 63-88. (1977). [Consulta: 2 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.31.100177.000431?journalCode=micro>
34. **Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., & Sarniguet, A.** “Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists”. *Microbiology and molecular biology reviews*. [en línea]. ( 2011).

pp.583-609. [Consulta: 3 abril 2016]. Disponible en:  
<http://mmbr.asm.org/content/75/4/583.short>

35. **Fuentes, A., Fresno, M. J., Santander, H., Valenzuela, S., Gutiérrez, M. F., & Miralles, R.** Sensopercepción olfatoria. *Scielo*, vol.(139),(3). [en línea]. (2011). pp. 363-367. [Consulta: 20 julio 2016]. Disponible en:  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872011000300013](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872011000300013)
36. **FUNDACIÓN USAL.** *Recuento de coliformes totales*. [en línea]. Laboratorio de Tecnología Educativa. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. (2016). [Consulta: 6 mayo 2016]. Disponible en:  
[http://virus.usal.es/Web/demo\\_fundacua/demo2/FiltraMembColiT\\_auto.html](http://virus.usal.es/Web/demo_fundacua/demo2/FiltraMembColiT_auto.html)
37. **Giraldo Gómez, G. I.** *Métodos de estudio de vida de anaquel de los alimentos*. [en línea]. Colombia. (1999). [Consulta: 11 septiembre 2016]. Disponible en:  
<http://www.bdigital.unal.edu.co/51276/1/metodosdeestudiodevidadeanaqueldelosalimentos.pdf>
38. **Golowczyc, M., Mobili, P., Garrote, G., Abraham, A., & De Antoni, G.** “Protective action of Lactobacillus kefir carrying S-layer protein against Salmonella enterica serovar Enteritidis”. *International Journal of Food Microbiology*, (118), [en línea]. (2007). pp. 264–273. [Consulta: 2 septiembre 2016]. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507003753>
39. **González, L., García, I., Pérez, R., Karla, G., & García, A.** *Obtención de azúcares fermentables a partir de inulinasas inmovilizadas por el método de sol-gel*. [en línea]. Universidad Simón Bolívar: (2007). [Consulta: 17 agosto 2016]. Disponible en:  
<file:///C:/Users/User/Downloads/Dialnet-ObtencionDeAzucaresFermentablesAPartirDeInulinasas-2695331.pdf>
40. **Görtz, H. D.** [en línea]. *Formen des Zusammenlebens*. Darmstadt: Wissenschaftliche. (1988). [Consulta: 19 julio 2016]. Disponible en:  
<https://www.booklooker.de/B%C3%BCher/G%C3%B6rtz+Formen-des-Zusammenlebens-Symbiose-Parasitismus-und-andere-Vergesellschaftungen-von-Tieren/id/A02bFhur01ZZp>
41. **Gulitz, A., Stadie, J., Ehrmann, M., Ludwig, W., & RF, V.** “Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis”. *The Society for Applied Microbiology.*, [en línea]. (2013). pp. 1082-1091. [Consulta: 14 agosto 2016]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23289707>
42. **Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M., & Vogel, R.** “The microbial diversity of water kefir”. *International Journal of Food Microbiology*, 151, [en línea]. (2011). pp. 284–288. [Consulta: 14 agosto 2016]. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511005344>
43. **Gullo, M., & Giudici, P.** “Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection.” *International Journal of Food Microbiology*, 125, [en línea]. (2008). pp. 46–53. [Consulta: 18 agosto 2016]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177968>
44. **Haller, L., Pote, J., Loizeau, J.-L., & Wildi, W.** “Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy”. *Lake Geneva*, [en línea]. (2009). pp. 540-547. [Consulta: 4 agosto 2016]. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470160X08001040>

45. **Harta, O., Iconomopoulou, M., Bekatorou, A., Nigam, P., Kontominas, M., & Koutinas, A.** "Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter [2004]". *Food Chemistry*. [en línea]. (2004). pp. 237–242. [Consulta: 25 mayo 2016]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/229145403\\_Effect\\_of\\_various\\_carbohydrate\\_substrates\\_on\\_the\\_production\\_of\\_kefir\\_grains\\_for\\_use\\_as\\_a\\_novel\\_baking\\_starter](https://www.researchgate.net/publication/229145403_Effect_of_various_carbohydrate_substrates_on_the_production_of_kefir_grains_for_use_as_a_novel_baking_starter)
46. **Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, R.** *Microbiología Industrial* (Primera ed.). San José , Costa Rica: EUNED. [en línea]. (2003). [Consulta: 2 marzo 2016]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
47. **NTE INEN 1529-18:98:** *Control Microbiológico De Los Alimentos Clostridium Perfringens Recuento En Tubo Por Siembra En Masa.*
48. **Jakob, F., Steger, S., & Vogel, R. F.** "Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads". *European Food Research and Technology*, 234, [en línea]. (2012). pp. 493-499. [Consulta: 18 agosto 2016]. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00217-011-1658-7>
49. **Jay, J.** *Fermented Foods and Related Products of Fermentation*. New York: Van Nostrand Reinhold. [en línea]. (1992). [Consulta: 7 agosto 2016]. Disponible en: [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-011-6480-1\\_16#page-1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-011-6480-1_16#page-1)
50. **Jay, J.** *Microbiología Moderna de los Alimentos. 4*, [en línea]. (2002). pp. 615. [Consulta: 8 agosto 2016]. Disponible en: <http://www.casadellibro.com/libro-microbiologia-moderna-de-los-alimentos/9788420011257/1772828>
51. **Kaditzky, S. B.** *Sucrose metabolism in lactobacilli and bifidobacteria*. [en línea]. Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie - Technischen Universität München. (2008). [Consulta: 2 agosto 2016]. Disponible en: <http://d-nb.info/98829561X/34>
52. **Kooiman, P.** "The chemical structure of kefirin, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain". *Carbohydrate Research*, [en línea]. (1967). pp. 200 - 211. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621500811386>
53. **Laureys, D., & De Vuyst, L.** "Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation". (M. W. Griffiths, Ed.) *AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY*, 80(7), [en línea]. (2014). pp. 2564-2572. [Consulta: 11 enero 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993195/>
54. **Laso, F.** "Diagnóstico diferencial en medicina interna". En F. Laso, *Diagnóstico diferencial en medicina interna (3a ed.) – ELSEVIER*. Barcelona: Foteletra. S.A. [en línea]. (2013). pp. 455-458. [Consulta: 21 marzo 2016]. Disponible en: <https://tienda.elsevier.es/diagnostico-diferencial-en-medicina-interna-studentconsult-en-espanol-9788480869447.html>
55. **López Mendiburu, F.** *BIOMASA. LA HERMANITA PEQUEÑA DE LAS RENOVABLES*. [en línea]. Desarrollo Rural y Reservas de la Biosfera. La esperanza de nuevos horizontes: (2001). [Consulta: 4 marzo 2016]. Disponible en: [http://www.coiaanpv.org/recursos/files/web/documentacion/articulos\\_de\\_colegiados/presentaciones\\_y\\_ponencias\\_de\\_colegiados/biomasa.\\_fredi\\_lopez\\_mendiburu.pdf](http://www.coiaanpv.org/recursos/files/web/documentacion/articulos_de_colegiados/presentaciones_y_ponencias_de_colegiados/biomasa._fredi_lopez_mendiburu.pdf)
56. **Luque Pino, J.** (*Calcio (ion Ca<sup>2+</sup>)*). [en línea]. Enciclopedia Salud - Universidad de Barcelona: 2007). [Consulta: 8 marzo 2016]. Disponible en: <http://www.encyclopediasalud.com/categorias/cuerpo-humano/articulos/calcio-ion-ca2>

57. **McArdle, W., Katch, F., & Victor, K. (s.f.).** *Fundamentos de la fisiología del ejercicio* (Segunda ed.). España: McGraw-Hill Interamericana de Epaña, S.A.U. [en línea]. (2004). [Consulta: 16 septiembre 2016]. Disponible en: <http://www.casadellibro.com/libro-fundamentos-de-fisiologia-del-ejercicio-2-ed/9788448605988/966143>
58. **Medline Plus.** *Vitaminas B.* [en línea]. Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. (2016). [Consulta: 16 marzo 2016]. Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/bvitamins.html>
59. **Monar, M. A.** Caracterización microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. [en línea]. (Tesis de pre grado). UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO. (2013). [Consulta: 26 septiembre 2016]. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2582/1/106854.pdf>
60. **Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Mario, C., Ramirez, & Lucia.** *Chemical and microbiological characterization of Ecuadorian homemade water kefir.* [en línea]. AVANCES en Ciencia y Tecnología. (2014). [Consulta: 16 febrero 2016]. Disponible en: [http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/avances/archivo\\_de\\_contenidos/Documents/volumen\\_6\\_numero\\_1/014\\_6\\_1\\_2014.pdf](http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/avances/archivo_de_contenidos/Documents/volumen_6_numero_1/014_6_1_2014.pdf)
61. **Moreira, M., Dos Santos, M., G.P.P., Z., Wouters, A., Carvalho, J., & Schneedorf, J.** “Anti-Inflammatory and Cicatrizing Activities of a Carbohydrate Fraction Isolated from Sugary Kefir”. *Journal of Medicinal Food*, 11, [en línea]. (2008). pp. 356-361. [Consulta: 24 octubre 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598180>
62. **Moreno, R.** *Determinación de las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales para la estandarización del proceso de elaboración de tepache.* (Grado).[en línea]. (2005). [Consulta: 22 junio 2016]. Disponible en: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI11992.pdf>
63. **Morris, W., & M.E., F.-M.** Toxinas de Clostridium perfringens. *Revista Argentina de Microbiología*, [en línea]. (2009). pp. 251-260. [Consulta: 19 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v41n4/v41n4a10.pdf>
64. **Moscoso Sánchez, A.** *El ácido láctico en la acidificación de mostos y vinos.* [en línea]. (2011). [Consulta: 7 septiembre 2016]. Disponible en: [http://www.worldbulkwine.com/conferencias/2011/purac\\_completo.pdf](http://www.worldbulkwine.com/conferencias/2011/purac_completo.pdf)
65. **NTE INEN 0341.** *Bebidas alcohólicas. Determinación de la acidez.*
66. **NTE INEN 1 529-11:98.** *CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. DETECCIÓN.*
67. **NTE INEN 1 529-18:98.** *CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS CLOSTRIDIUM PERFRINGENS RECUENTO EN TUBO POR SIEMBRA EN MASA.*
68. **NTE INEN 2395.** *LECHES FERMENTADAS. REQUISITOS.*
69. **NTE INEN 2983.** *SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS. REQUISITOS.*
70. **Ocampo González, O. P.** Elaboración Y Conservación De Néctares A Partir Del Lulo Variedad “ *La selva*”. [en línea]. (Grado). UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. (2000). [Consulta: 8 junio 2016]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/11053512.pdf>
71. **Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonat, M.** Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25(121), [en

- línea]. (2007). pp. 20-33. [Consulta: 7 noviembre 2015]. Disponible en: <http://andeguat.org.gt/wp-content/uploads/2015/03/Alimentos-funcionales-fibra-prebi%C3%B3ticos-probi%C3%B3ticos-y-simbi%C3%B3ticos1.pdf>
72. **Palmetti, N.** *Nutrición Depurativa*. Córdoba - Argentina: Corintios 13 - Av. Vélez Sarsfield 598. (2010). [Consulta: 5 abril 2016]. Disponible en: [http://www.espaciodepurativo.com.ar/libros\\_saludables/nutricion\\_depurativa.php](http://www.espaciodepurativo.com.ar/libros_saludables/nutricion_depurativa.php)
  73. **Pascual Anderson, M. d., & Calderón, V.** Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. En M. d. Pascual Anderson, & V. Calderón, *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Madrid: Díaz de Santos. [en línea]. (2000). pp. 142-147. [Consulta: 23 septiembre 2016]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books/about/Microbiolog%C3%ADa\\_Alimentaria.html?id=9EIfkks8uxMC](https://books.google.com.ec/books/about/Microbiolog%C3%ADa_Alimentaria.html?id=9EIfkks8uxMC)
  74. **Paucar Barreno, C.** CARACTERIZACIÓN DE UNA BEBIDA NUTRITIVA Y BIOMASA PARA ALIMENTO ANIMAL MEDIANTE FERMENTACIÓN SUMERGIDA CON MICROORGANISMOS TIBETANOS. (2015). Riobamba, Chimborazo, Ecuador.
  75. **Pérez Leonard, H.** Beneficios de las levaduras vivas en la obtención de productos con actividad probiótica. *ICIDCA*, (41), (3), [en línea]. (2007). pp. 35-41. [Consulta: 9 enero 2016]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223120666005.pdf>
  76. **Pérez Vega, C.** *Visión, Luz y Color*. [en línea]. Universidad de la Cantabria. (2006). [Consulta: 20 octubre 2016]. Disponible en: <http://personales.unican.es/perezvr/pdf/Vision%20Luz%20y%20Color.pdf>
  77. **Petrifilm™.** *Levaduras y Mohos*. [en línea]. 3M. (2016). [Consulta: 7 septiembre 2016]. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MohosyLevadurasporPetrifilm\\_19101.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MohosyLevadurasporPetrifilm_19101.pdf)
  78. **Petrifilm™.** *Placas para Recuento de Coliformes*. [en línea]. 3M. (2016). [Consulta: 7 septiembre 2016]. Disponible en: [http://solutions.productos3m.es/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=en\\_WW&lmd=1307530120000&assetId=1273685360597&assetType=MMM\\_Image&blobAttribute=ImageFile](http://solutions.productos3m.es/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=en_WW&lmd=1307530120000&assetId=1273685360597&assetType=MMM_Image&blobAttribute=ImageFile)
  79. **Pidoux, M.** “The microbial-flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant) - biosynthesis of the grain from *Lactobacillus-Hilgardii* producing a polysaccharide gel”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, [en línea]. (1989). pp. 223-238. [Consulta: 20 enero 2016]. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF01741847>
  80. **Pidoux, M., Marshall, V. M., P., Z., & B., B.** “Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation”. (A. Gilmour, Ed.) *Journal of Applied Microbiology*, 69, [en línea]. (1990). pp. 311–320. [Consulta: 20 enero 2016]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01521.x/full>
  81. **Ramírez, J., Petra, R., Velázquez, M., Ulloa, J., & Francisco, A.** *Bacterias lácticas: Importancia en los alimentos y sus efectos en la salud*. [en línea]. Universidad Autónoma de Nayarit. (2011). [Consulta: 2 febrero 2016]. Disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
  82. **Ramírez, N., Serrano, J. A., & Horacio, S.** Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, (37), (3), [en línea].

- (2006). pp. 56-71. [Consulta: 14 marzo 2016]. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937307>
83. **Ratser.** *La definición de azúcares reductores.* [en línea]. (2016). [Consulta: 20 septiembre 2016]. Disponible en: <http://www.ratser.com/la-definicion-de-azucares-reductores/>
  84. **Rodríguez Prado, M.** *Factores que afectan a la Fermentación microbiana, y al perfil y flujo de aminoácidos de las bacterias asociadas con las fracciones líquida y sólida en un sistema de cultivo continuo.* [en línea]. Universitat Autònoma de Barcelona. (2003). [Consulta: 5 octubre 2016]. Disponible en:  
[http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Eficiencia\\_microbial\\_en\\_rumen.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Eficiencia_microbial_en_rumen.pdf)
  85. **Roman, J., de Arpe, C., Urrialde, R., Fontecha, J., Murcia, M. A., Gomez, C.** *Nuevos alimentos para nuevas necesidades.* [en línea]. Nutrición y Salud. (2003). [Consulta: 7 enero 2016]. Disponible en: [http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/nuevos\\_alimentos.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/nuevos_alimentos.pdf)
  86. **Romero Rodríguez, González Rodríguez, M., Lage - Yusty, M., López, H, Paseiro Lozada, & Simal Lozano, J.** “Identificación y cuantificación por HPLC de los ácidos orgánicos mayoritarios en frutas”. *ResearchGate*, [en línea]. (1990). pp. 299-306. [Consulta: 20 septiembre 2016]. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/235433422\\_Identificacion\\_y\\_cuantificacion\\_por\\_HPLC\\_de\\_los\\_acidos\\_organicos\\_mayoritarios\\_en\\_frutas](https://www.researchgate.net/publication/235433422_Identificacion_y_cuantificacion_por_HPLC_de_los_acidos_organicos_mayoritarios_en_frutas)
  87. **Sanz, J., M.C., C., & J., D.** “Probióticos: criterios de Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo”. [en línea]. (2003). pp. 476-482. [Consulta: 3 marzo 2016]. Disponible en: <https://gastroinf.es/sites/default/files/files/SecciNutri/PROBIOTICO.pdf>
  88. **Schneedorf, J. M.** *Kefir D’Aqua and Its Probiotic Properties.* [en línea]. (2012). [Consulta: 22 enero 2016]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/probiotic-in-animals/kefir-d-aqua-and-its-probiotic-properties>
  89. **Seguí, M. J.** *Estructura y propiedades de las proteínas .* [en línea]. (2016). [Consulta: 4 febrero 2016]. Disponible en: [http://www.uv.es/tunon/pdf\\_doc/trabajo\\_matilde.pdf](http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/trabajo_matilde.pdf)
  90. **Simpson, P. J., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C.** “Bifidobacterium psychraerophilum sp. nov. and Aeriscardovia aeriphila gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [en línea]. (2004). pp. 401-406. [Consulta: 28 enero 2016]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023951>
  91. **Stadie, J.** “*Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir*”. [en línea]. TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN - Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie. (2013). [Consulta: 16 enero 2016]. Disponible en:  
<https://mediatum.ub.tum.de/doc/1161074/1161074.pdf>
  92. **Tannock.** *Probiotics. THE INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS’ EXPERT PANEL ON FOOD SAFETY AND NUTRITION, (53), (11),* [en línea]. (1999). pp. 67-77. [Consulta: 11 junio 2016]. Disponible en:  
<https://www.yumpu.com/en/document/view/4226686/probiotics-institute-of-food-technologists>
  93. **Teixeira Magalhães, K., Vinícius de Melo Pereira, G., Campos, C. R., Dragone, G., & Freitas Schwan, R.** “Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition”. *Brazilian Journal of Microbiology*, [en línea]. (2011). pp. 693-702. [Consulta:

14 febrero 2016]. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822011000200034&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822011000200034&script=sci_arttext)

94. **Thomson. PLM.** [en línea]. PLM Líder en Información de Ciencias de la Salud. (2004). [Consulta: 26 julio 2016]. Disponible en: [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib\\_vv=6](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6)
95. **Universidad de Alcalá.** *Equilibrio ácido - base.* [en línea]. (2016). [Consulta: 18 abril 2016]. Disponible en: [http://www3.uah.es/edejesus/resumenes/QG/Tema\\_13.pdf](http://www3.uah.es/edejesus/resumenes/QG/Tema_13.pdf)
96. **Universidad de Granada.** *Diversidad Microbiana y Taxonomía .* [en línea]. (2015). [Consulta: 20 abril 2016]. Disponible en: UGR: [http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=765&Itemid=827](http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=765&Itemid=827)
97. **Universidad de la Frontera.** *El Refractómetro.* [en línea]. [en línea]. . (2007). [Consulta: 4 febrero 2016]. Disponible en: [http://ufro.cl/~explora/index\\_archivos/refractometro.pdf](http://ufro.cl/~explora/index_archivos/refractometro.pdf)
98. **Waldherr, F. W.** *Comparative analysis of fructosyltransferases of lactobacilli .* [en línea]. TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN - Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie. (2009). [Consulta: 17 enero 2016]. Disponible en: <https://mediatum.ub.tum.de/doc/795503/795503.pdf>
99. **Waldherr, F. W., Doll, V. M., Meißner, D., & Vogel, R. F.** “Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir”. *Food Microbiology*, 27, [en línea]. (2010). pp. 672–678. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510787>
100. **Walter, P.** 10 Years of Functional Foods in Europe. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, [en línea]. (2013). pp. 253-260. [Consulta: 19 enero 2016]. Disponible en: <http://econtent.hogrefe.com/doi/abs/10.1024/0300-9831.78.6.253>
101. **Yanping, W., Nv, X., Aodeng, X., Zaheer, A., Bin, Z., & Xiaoja, B.** “Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet”. *Applied Microbiology Biotechnology*, 84, [en línea]. (2009). pp. 341-347. [Consulta: 2 febrero 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19444443>
102. **Yemoos Nutritiva Culturales.** *Water Kefir History.* (Yemoos) [en línea]. Yemoos - Nourishing Cultures. (2015). [Consulta: 14 abril 2016]. Disponible en: <http://www.yemoos.com/waterkefirhistory.html>

## ANEXOS

Anexo 1. Selección del mejor sustrato azucarado para la elaboración de la bebida nutritiva y biomasa para alimentación animal con microorganismos tibetanos.

TIEMPO DE FERMENTACIÓN	PARÁMETROS DE MEDICIÓN	NIVELES DE SUSTRATO (gramos)									
		TM - 20	TM - 40	TP - 20	TP - 40	TAB - 20	TAB - 40	TG - 20	TG - 40	TAM - 20	TAM - 40
0 HORAS	pH - 0	5,3	5,6	6,1	6,1	6,5	7,1	6,5	6,4	6,3	6,7
	Peso - 0	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
6 HORAS	pH - 1	4,6	5,7	6	6	6,7	7,5	7,1	6,7	6,4	7,2
24 HORAS	pH - 2	3,7	4,5	4,1	4,1	5,9	6,9	5,9	5,7	5,9	6,7
	Peso - 2	100	96,2	100,5	103,1	97,5	99,1	100	98,7	97,5	108,7
30 HORAS	pH - 3	3,6	4,4	3,7	3,7	5,5	6,3	4,6	3,7	4,8	5,9
48 HORAS	pH - 4	3,3	4,1	2,8	3	2,7	5,3	2,7	2,6	2,9	4,5
	Peso - 4	105	106,7	105,4	111,4	108	117,9	94	101,4	108,2	118,5
54 HORAS	pH - 5	3,3	4,1	2,7	2,9	2,5	3,1	2,5	2,5	2,7	3,2
72 HORAS	pH - 6	3,2	3,8	2,6	2,9	2,5	3,1	2,5	2,5	2,7	3,1
	Peso - 6	99,5	102,5	107,7	121,1	105,3	125,8	89,2	96,5	104,4	122,1
80 HORAS	pH - 7	3,3	3,7	2,6	2,8	2,5	3	2,4	2,4	2,5	3
120 HORAS	pH - 8	3,3	3,5	2,5	2,7	2,3	2,8	2,4	2,3	2,4	2,7
	Peso - 8	103,5	114	116,7	143,5	113,1	150	90,4	99,4	104,5	137,3
144 HORAS	pH - 9	3,5	3,5	2,4	2,7	2,3	2,7	2,3	2,5	2,3	2,7

Anexo 2. Resultado del análisis de la temperatura.

**Descriptivos**

Temperatura

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	20,100	0,0000	0,0000	20,100	20,100
PANELA 30	20,167	,0577	,0333	20,023	20,310
PANELA 40	20,233	,1155	,0667	19,946	20,520
PANELA 50	20,233	,1528	,0882	19,854	20,613
PANELA 60	20,133	,0577	,0333	19,990	20,277
Total	20,173	,0961	,0248	20,120	20,227

**ANOVA de un factor**

Temperatura

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,043	4	,011	1,231	,358
Intra-grupos	,087	10	,009		
Total	,129	14			

**Temperatura**

HSD de Tukey

	Subconjunto para alfa = 0.05
TRATAMIENTOS	1
PANELA 20	20,100
PANELA 60	20,133
PANELA 30	20,167
PANELA 50	20,233
PANELA 40	20,233
Sig.	,447

Anexo 2. Resultado del análisis de la biomasa.

**Descriptivos**

Peso\_Biomasa

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	159,433	12,5608	7,2520	128,231	190,636
PANELA 30	169,633	,4163	,2404	168,599	170,668
PANELA 40	188,367	2,8572	1,6496	181,269	195,464
PANELA 50	202,367	4,7648	2,7510	190,530	214,203
PANELA 60	215,733	9,4113	5,4336	192,354	239,112
Total	187,107	22,2486	5,7446	174,786	199,428

**ANOVA de un factor**

Peso\_Biomasa

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6375,216	4	1593,804	28,729	,000***
Intra-grupos	554,773	10	55,477		
Total	6929,989	14			

**Peso\_Biomasa**

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
PANELA 20	159,433			
PANELA 30	169,633	169,633		
PANELA 40		188,367	188,367	
PANELA 50			202,367	202,367
PANELA 60				215,733
Sig.	,487	,069	,221	,255

Anexo 3. Resultado del análisis de la proteína.

**Descriptivos**

Proteína

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	,04500	,007071	,005000	-,01853	,10853
PANELA 30	,05000	0,000000	0,000000	,05000	,05000
PANELA 40	,06000	0,000000	0,000000	,06000	,06000
PANELA 50	,06500	,007071	,005000	,00147	,12853
PANELA 60	,08000	0,000000	0,000000	,08000	,08000
Total	,06000	,013333	,004216	,05046	,06954

**ANOVA de un factor**

Proteína

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,002	4	,000	18,750	,003**
Intra-grupos	,000	5	,000		
Total	,002	9			

**Proteína**

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
PANELA 20	,04500		
PANELA 30	,05000	,05000	
PANELA 40	,06000	,06000	
PANELA 50		,06500	,06500
PANELA 60			,08000
Sig.	,095	,095	,095

Anexo 4. Resultado del análisis del Calcio.

**Descriptivos**

Calcio

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	56,0200	,25456	,18000	53,7329	58,3071
PANELA 30	65,4200	,14142	,10000	64,1494	66,6906
PANELA 40	60,6200	,31113	,22000	57,8246	63,4154
PANELA 50	50,9000	,11314	,08000	49,8835	51,9165
PANELA 60	49,5350	,13435	,09500	48,3279	50,7421
Total	56,4990	6,26717	1,98185	52,0157	60,9823

**ANOVA de un factor**

Calcio

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	353,285	4	88,321	2078,635	,000***
Intra-grupos	,212	5	,042		
Total	353,497	9			

**Calcio**

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	Subconjunto para alfa = 0.05				
	1	2	3	4	5
PANELA 60	49,5350				
PANELA 50		50,9000			
PANELA 20			56,0200		
PANELA 40				60,6200	
PANELA 30					65,4200
Sig.	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Anexo 4. Resultado del análisis de fósforo.

**Descriptivos**

Fósforo

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	1,000	0,0000	0,0000	1,000	1,000
PANELA 30	1,000	0,0000	0,0000	1,000	1,000
PANELA 40	1,000	0,0000	0,0000	1,000	1,000
PANELA 50	1,000	0,0000	0,0000	1,000	1,000
PANELA 60	1,000	0,0000	0,0000	1,000	1,000
Total	1,000	0,0000	0,0000	1,000	1,000

**ANOVA de un factor**

Fósforo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,000	4	0,000		
Intra-grupos	0,000	5	0,000		
Total	0,000	9			

Anexo 5. Resultado del análisis de magnesio.

**Descriptivos**

Magnesio

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	87,9150	,14849	,10500	86,5808	89,2492
PANELA 30	94,4050	,27577	,19500	91,9273	96,8827
PANELA 40	94,8900	,31113	,22000	92,0946	97,6854
PANELA 50	97,6850	,21920	,15500	95,7155	99,6545
PANELA 60	96,9800	,05657	,04000	96,4718	97,4882
Total	94,3750	3,64731	1,15338	91,7659	96,9841

**ANOVA de un factor**

Magnesio

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	119,480	4	29,870	606,742	,000***
Intra-grupos	,246	5	,049		
Total	119,726	9			

**Magnesio**

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
PANELA 20	87,9150		
PANELA 30		94,4050	
PANELA 40		94,8900	
PANELA 60			96,9800
PANELA 50			97,6850
Sig.	1,000	,315	,113

Anexo 6. Resultado del análisis de potasio.

**Descriptivos**

Potasio

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	148,7200	1,17380	,83000	138,1739	159,2661
PANELA 30	183,2950	1,91626	1,35500	166,0781	200,5119
PANELA 40	242,1600	,09899	,07000	241,2706	243,0494
PANELA 50	303,5700	,11314	,08000	302,5535	304,5865
PANELA 60	357,2050	,47376	,33500	352,9484	361,4616
Total	246,9900	80,39993	25,42469	189,4754	304,5046

**ANOVA de un factor**

Potasio

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	58172,035	4	14543,009	13727,849	,000***
Intra-grupos	5,297	5	1,059		
Total	58177,332	9			

**Potasio**

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	Subconjunto para alfa = 0.05				
	1	2	3	4	5
PANELA 20	148,7200				
PANELA 30		183,2950			
PANELA 40			242,1600		
PANELA 50				303,5700	
PANELA 60					357,2050
Sig.	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Anexo 7. Resultado del análisis de hierro.

**Descriptivos**

Hierro

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	5,255	,0495	,0350	4,810	5,700
PANELA 30	5,185	,1202	,0850	4,105	6,265
PANELA 40	6,385	,0919	,0650	5,559	7,211
PANELA 50	7,440	,0141	,0100	7,313	7,567
PANELA 60	10,480	,5233	,3700	5,779	15,181
Total	6,949	2,0633	,6525	5,473	8,425

### ANOVA de un factor

Hierro

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	38,017	4	9,504	158,748	,000***
Intra-grupos	,299	5	,060		
Total	38,316	9			

### Hierro

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
PANELA 30	5,185			
PANELA 20	5,255			
PANELA 40		6,385		
PANELA 50			7,440	
PANELA 60				10,480
Sig.	,998	1,000	1,000	1,000

Anexo 8. Resultado del análisis de manganeso.

### Descriptivos

Manganeso

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
PANELA 30	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
PANELA 40	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
PANELA 50	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
PANELA 60	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
Total	,500	0,0000	0,0000	,500	,500

## ANOVA de un factor

Manganeso

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,000	4	0,000		
Intra-grupos	0,000	5	0,000		
Total	0,000	9			

Anexo 9. Resultado del análisis de Cobre.

## Descriptivos

Cobre

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
PANELA 30	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
PANELA 40	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
PANELA 50	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
PANELA 60	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
Total	,500	0,0000	0,0000	,500	,500

## ANOVA de un factor

Cobre

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,000	4	0,000		
Intra-grupos	0,000	5	0,000		
Total	0,000	9			

Anexo 10. Resultado del análisis de zinc.

**Descriptivos**

Zinc

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	,300	0,0000	0,0000	,300	,300
PANELA 30	,300	0,0000	0,0000	,300	,300
PANELA 40	,300	0,0000	0,0000	,300	,300
PANELA 50	,300	0,0000	0,0000	,300	,300
PANELA 60	,500	0,0000	0,0000	,500	,500
Total	,340	,0843	,0267	,280	,400

**ANOVA de un factor**

Zinc

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,064	4	,016		
Intra-grupos	0,000	5	0,000		
Total	,064	9			

Anexo 11. Resultado del análisis de Vitamina B6.

**Descriptivos**

Vitamina\_B6

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	,200				
PANELA 30	,200				
PANELA 40	,300				
PANELA 50	,300				
PANELA 60	,400				
Total	,280	,0837	,0374	,176	,384

**ANOVA de un factor**

Vitamina\_B6

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,028	4	,007		
Intra-grupos	0,000	0			
Total	,028	4			

Anexo 12. Resultado del análisis de pH.

**Descriptivos**

pH

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	3,30	0,000	0,000	3,30	3,30
PANELA 30	3,40	0,000	0,000	3,40	3,40
PANELA 40	3,40	0,000	0,000	3,40	3,40
PANELA 50	3,50	0,000	0,000	3,50	3,50
PANELA 60	3,50	0,000	0,000	3,50	3,50
Total	3,42	,077	,020	3,38	3,46

**ANOVA de un factor**

pH

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,084	4	,021		
Intra-grupos	0,000	10	0,000		
Total	,084	14			

Anexo 14. Resultado del análisis de acidez total.

**Descriptivos**

Acidez\_Total

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	450,00	0,000	0,000	450,00	450,00
PANELA 30	495,00	0,000	0,000	495,00	495,00
PANELA 40	600,00	25,981	15,000	535,46	664,54
PANELA 50	645,00	25,981	15,000	580,46	709,54
PANELA 60	675,00	0,000	0,000	675,00	675,00
Total	573,00	90,747	23,431	522,75	623,25

**ANOVA de un factor**

Acidez\_Total

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	112590,000	4	28147,500	104,250	,000
Intra-grupos	2700,000	10	270,000		
Total	115290,000	14			

**Acidez\_Total**

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
PANELA 20	450,00			
PANELA 30		495,00		
PANELA 40			600,00	
PANELA 50				645,00
PANELA 60				675,00
Sig.	1,000	1,000	1,000	,242

Anexo 15. Resultado del análisis de grados brix.

**Descriptivos**

Grados\_Brix

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	2,00	0,000	0,000	2,00	2,00
PANELA 30	2,33	,289	,167	1,62	3,05
PANELA 40	3,00	0,000	0,000	3,00	3,00
PANELA 50	4,00	0,000	0,000	4,00	4,00
PANELA 60	5,00	0,000	0,000	5,00	5,00
Total	3,27	1,147	,296	2,63	3,90

**ANOVA de un factor**

Grados\_Brix

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	18,267	4	4,567	274,000	,000
Intra-grupos	,167	10	,017		
Total	18,433	14			

**Grados\_Brix**

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
PANELA 20	2,00			
PANELA 30	2,33			
PANELA 40		3,00		
PANELA 50			4,00	
PANELA 60				5,00
Sig.	,061	1,000	1,000	1,000

Anexo 16. Resultado del análisis de azúcares reductores.

**Descriptivos**

Azúcares\_Reductores

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	,300	0,0000	0,0000	,300	,300
PANELA 30	,400	0,0000	0,0000	,400	,400
PANELA 40	,667	,0577	,0333	,523	,810
PANELA 50	,700	0,0000	0,0000	,700	,700
PANELA 60	1,033	,1155	,0667	,746	1,320
Total	,620	,2704	,0698	,470	,770

**ANOVA de un factor**

Azúcares\_Reductores

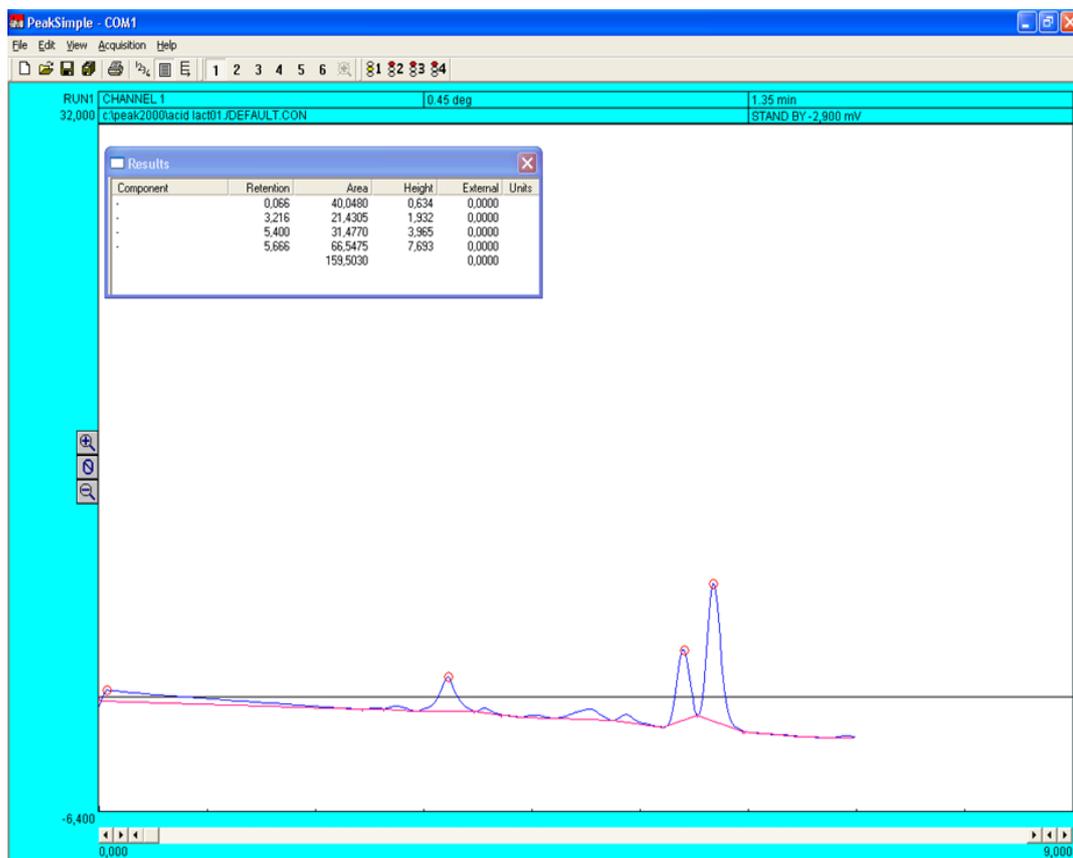
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,991	4	,248	74,300	,000
Intra-grupos	,033	10	,003		
Total	1,024	14			

**Azúcares\_Reductores**

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
PANELA 20	,300		
PANELA 30	,400		
PANELA 40		,667	
PANELA 50		,700	
PANELA 60			1,033
Sig.	,283	,950	1,000

Anexo 17. Resultado del análisis de ácido láctico.



**Descriptivos**

Ácido\_Láctico

	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PANELA 20	,41770	,024064	,013893	,35792	,47748
PANELA 30	,49700	,061294	,035388	,34474	,64926
PANELA 40	,48833	,025968	,014993	,42383	,55284
PANELA 50	,54533	,019502	,011260	,49689	,59378
PANELA 60	,66900	,126428	,072993	,35494	,98306
Total	,52347	,102500	,026465	,46671	,58024

**ANOVA de un factor**

Ácido\_Láctico

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,104	4	,026	6,102	,009
Intra-grupos	,043	10	,004		
Total	,147	14			

**Ácido\_Láctico**

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
PANELA 20	,41770	
PANELA 40	,48833	
PANELA 30	,49700	,49700
PANELA 50	,54533	,54533
PANELA 60		,66900
Sig.	,195	,056

Anexo 18. Resultado del análisis de sabor color, sabor y olor.

**Tabla de contingencia TRATAMIENTOS \* COLOR**

Recuento

		COLOR					Total
		1	2	3	4	5	
TRATAMIENTOS	PANELA 20%	9	20	9	8	5	51
	PANELA 30%	4	11	18	15	3	51
	PANELA 40%	2	5	20	20	4	51
	PANELA 50%	0	2	17	23	9	51
	PANELA 60%	1	6	10	13	21	51
Total		16	44	74	79	42	255

**Tabla de contingencia TRATAMIENTOS \* SABOR**

Recuento

		SABOR					Total
		1	2	3	4	5	
TRATAMIENTOS	PANELA 20%	9	17	16	5	4	51
	PANELA 30%	4	16	20	7	4	51
	PANELA 40%	1	9	23	13	5	51
	PANELA 50%	2	6	22	18	3	51
	PANELA 60%	0	14	13	12	12	51
Total		16	62	94	55	28	255

**Tabla de contingencia TRATAMIENTOS \* OLOR**

Recuento

		OLOR					Total
		1	2	3	4	5	
TRATAMIENTOS	PANELA 20%	15	14	13	6	3	51
	PANELA 30%	8	15	16	9	3	51
	PANELA 40%	3	10	17	12	9	51
	PANELA 50%	5	12	15	15	4	51
	PANELA 60%	3	7	20	13	8	51
Total		34	58	81	55	27	255

Anexo 19. Encuesta aplicada en el análisis afectivo - hoja de trabajo

Fecha: _____	Código de la prueba: <u>M10M2015</u>
<b>Coloque esta hoja junto a usted siempre en el área de trabajo y durante la prueba, tenga todo a la mano</b>	
Tipo de muestra: <u>Bebida fermentada</u>	
<b>Identificación de la Muestra</b>	<b>Código</b>
Bebida fermentada (T1)	2082
Bebida fermentada (T2)	5683
Bebida fermentada (T3)	6553
Bebida fermentada (T4)	9265
Bebida fermentada (T5)	6330

Anexo 20. Encuesta aplicada en el análisis afectivo - hoja de respuesta

Nombre \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Número de panelista: \_\_\_\_\_

Producto: Bebida Nutritiva

**Instrucciones:**

Usted ha recibido cinco muestras. Pruebe las cinco muestras de izquierda a derecha y acomódelas de menor a mayor intensidad de sabor. Considere que 5= Muy fuerte; 4= Fuerte; 3=Normal; 2= Débil y 1= Muy débil

MUESTRA	ATRIBUTOS	1	2	3	4	5
6330	COLOR					
	SABOR					
	AROMA					
5683	COLOR					
	SABOR					
	AROMA					
9265	COLOR					
	SABOR					
	AROMA					
2082	COLOR					
	SABOR					
	AROMA					
6553	COLOR					
	SABOR					
	AROMA					

**Comentarios**

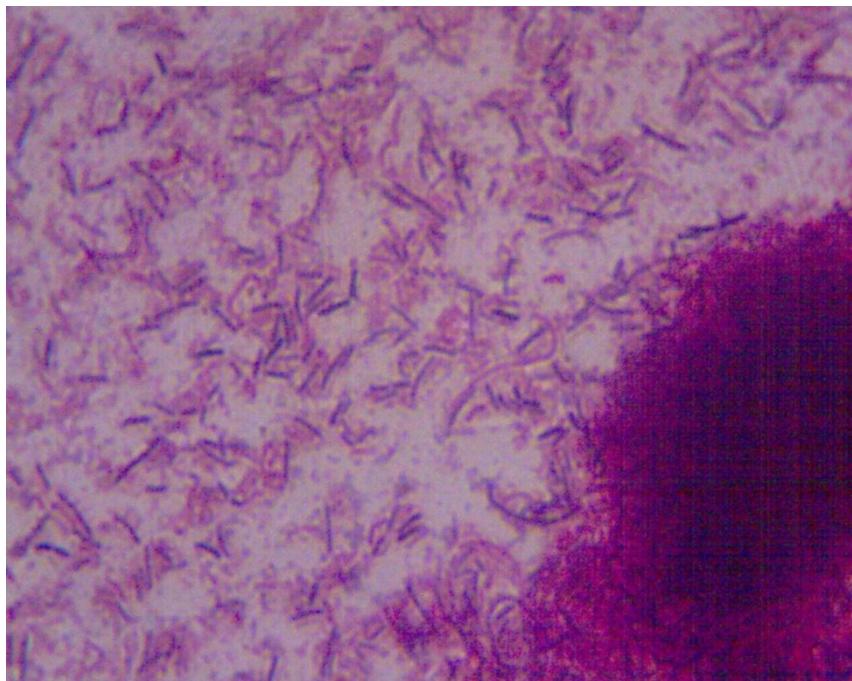
---

---

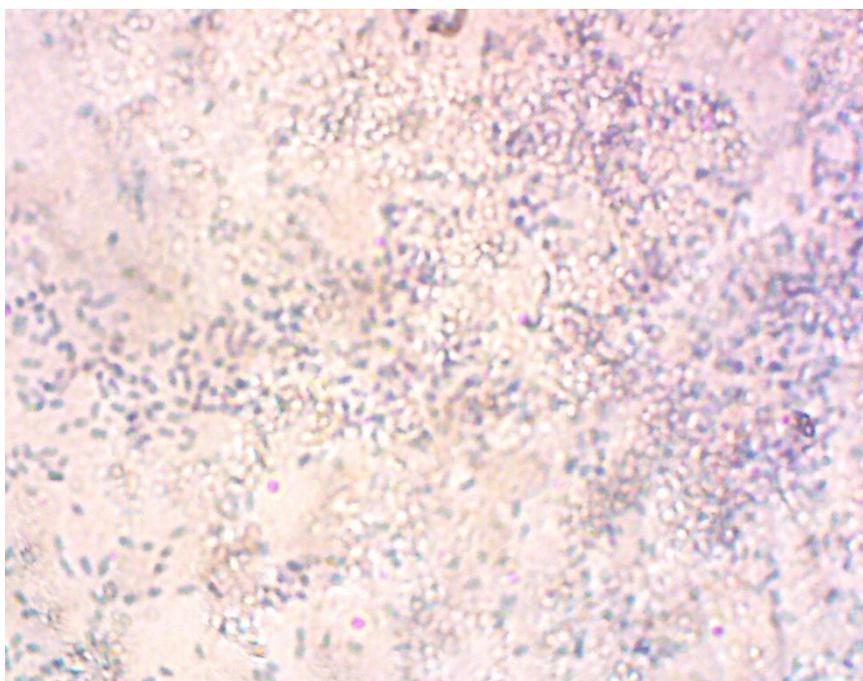
---

Gracias por su participación

Anexo 21. Bacterias ácido lácticas observadas al microscopio con tinción Gram.



Anexo 22. Levaduras observadas al microscopio con azul de metileno.



Anexo 22. Costes de producción de la bebida.

Bebidas	Coste de insumos para la producción de la bebida por litro			
	Panela	Agua Purificada	Biomasa Base	Total - dólares
T1	0,02	0,10	0,08	0,20
T2	0,03	0,10	0,08	0,21
T3	0,04	0,10	0,08	0,22
T4	0,05	0,10	0,08	0,23
T5	0,06	0,10	0,08	0,24