

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

Formulación de una bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón

Presentado por:

José Amilcar Taype Ramos

Para optar el Título de Ingeniero Agroindustrial

Abancay, Perú

2023



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

Facultad de Ingeniería

Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial



Tesis

FORMULACIÓN DE UNA BEBIDA SIMBIÓTICA FUNCIONAL CON GRANOS DE KÉFIR Y JARABE DE YACÓN

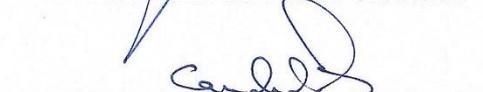
Presentado por **José Amilcar Taype Ramos**, para optar el Título de:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Sustentado y aprobado el 29 de setiembre del 2021 ante el Jurado Evaluador:

Presidente:


M. Sc. Víctor Sarmiento Casavilca

Primer Miembro:

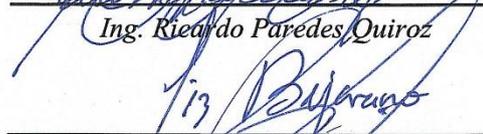

Lic. Candida Lopez Loayza

Segundo Miembro:


Ing. Alex Muñoz Cáceres

Asesor (es):


Ing. Ricardo Paredes Quiroz


Dra. Dagnith Liz Bejarano Luján



“Formulación de una bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón”

Línea de investigación: Caracterización, desarrollo de procesos e innovación en la agroindustria

Esta publicación está bajo una Licencia *Creative Commons*



Dedicatoria

Dedico de manera especial a Dios, que es por sobre todo nombre, a mis padres que fueron la motivación, los amigos y finalmente a todos los docentes de las diferentes instituciones que dieron su aporte para el fin de esta investigación.

José Amilcar Taype Ramos



Agradecimiento

Quiero agradecer de manera muy especial a Dios de los cielos por proveer los medios y recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto de tesis, desde luego también hacer mención a mis estimados asesores Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz, Dra. Dagnith Liz Bejarano Luján y Dra. Flor Teresa García Huamán por su apoyo y guía incondicional durante la realización de la tesis.

Agradecer a la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial por brindar la facilidad de uso de laboratorios durante los ensayos de experimentación.

José Amilcar Taype Ramos



ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 Descripción del problema	3
1.2 Enunciado del Problema	4
1.2.1 Problema general	4
1.2.2 Problemas específicos.....	4
1.2.3 Justificación de la investigación	5
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	7
2.1 Objetivos de la investigación	7
2.2.1 Objetivo general.....	7
2.2.2 Objetivos específicos	7
2.2 Hipótesis de la investigación	7
2.2.3 Hipótesis general.....	7
2.2.4 Hipótesis específicas.....	7
2.3 Operacionalización de variables	8
CAPÍTULO III	9
MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	9
3.1 Antecedentes.....	9
3.2 Marco teórico.....	10
3.2.1 Alimentos funcionales	10
3.2.2 Alimentos simbióticos	12
3.2.3 Prebióticos.....	12
3.2.3.1 Efecto y rasgos de los prebióticos.....	12
3.2.3.2 Carbohidratos no digeribles	13
3.2.3.3 Yacón.....	14
3.2.4 Probiótico.....	20
3.2.4.1 Kéfir.....	21
3.2.4.2 Granos de kéfir.....	23
3.2.4.3 Microflora de los granos de kéfir.....	24
3.2.4.4 Aspectos tecnológicos del kéfir	29
3.2.4.5 Diferencias entre el kéfir y el yogurt	33
3.2.4.6 Efectos beneficiosos sobre la salud del kéfir	33



3.2.5 Leches fermentadas.....	35
3.3 Marco conceptual.....	36
CAPÍTULO IV.....	37
METODOLOGÍA.....	37
4.1 Tipo y nivel de investigación.....	37
4.2 Diseño de la investigación.....	37
4.3 Descripción estadística de la investigación.....	37
4.4 Población y muestra.....	38
4.5 Procedimiento de la investigación.....	39
4.5.1 Medio de cultivo patrón.....	39
4.5.2 Probiótico.....	39
4.5.3 Prebiótico.....	39
4.5.4 Obtención de jarabe de yacón.....	40
4.5.5 Ensayos de fermentación.....	40
CAPÍTULO V.....	47
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	47
5.1 Análisis de resultados.....	47
5.1.1. Determinación simultánea del tiempo de fermentación y concentración de jarabe de yacón en la formulación de la bebida simbiótica funcional.....	47
5.1.2. Determinación de rendimiento de biomasa húmeda en la bebida simbiótica funcional formulada.....	47
5.1.3. Medición de pH en la fermentación de la bebida simbiótica funcional.....	51
5.1.4. Prueba de aceptabilidad en la formulación de la bebida simbiótica funcional.....	54
5.1.5. Análisis fisicoquímico y microbiológico de la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón.....	57
5.2 Discusiones.....	58
CAPÍTULO VI.....	63
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	63
6.1 Conclusiones.....	63
6.2 Recomendaciones.....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	64



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 – Descripción de variables dependientes e independientes	8
Tabla 2 – Clasificación de los carbohidratos no digeribles	13
Tabla 3 – Producción de yacón en el departamento de Apurímac	15
Tabla 4 – Composición química de yacón por 1 kg de raíz tuberosa fresca.....	19
Tabla 5 – Composición química de g/100g de jarabe de yacón.....	20
Tabla 6 – Especies más frecuente en los granos de kéfir.....	25
Tabla 7 – Requisitos químicos de la norma internacional Codex STAN 243. 2003, norma del Codex para leches fermentadas.	35
Tabla 8 – Diseño factorial para formulación de una bebida simbiótica funcional	38
Tabla 9 – ANOVA para análisis de datos de biomasa y pH de la bebida simbiótica funcional.....	38
Tabla 10 – Rendimiento de biomasa húmeda (g) en función a la concentración de jarabe de yacón y tiempo de fermentación.....	48
Tabla 11 – Análisis de varianza (ANOVA) de dos factores de rendimiento biomasa húmeda.....	49
Tabla 12 – Resultados de promedio de pH fermentación en la bebida simbiótica funcional formulada.....	51
Tabla 13 – Análisis de varianza (ANOVA) de dos factores de medición de pH.....	52
Tabla 14 – Preferencias de los panelistas de degustación del dulzor de la bebida simbiótica a diferentes concentraciones de jarabe de yacón y tiempo de fermentación 12 h.....	54
Tabla 15 – Estadísticos de degustación para concentraciones de jarabe de yacón y 12h de fermentación.....	56
Tabla 16 – Estadísticos de contraste de prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluación del dulzor de la bebida simbiótica funcional ^{a,b}	56
Tabla 17 – Determinación fisicoquímica promedio realizada en 100 g de bebida simbiótica funcional aceptable.....	57
Tabla 18 – Promedio de recuento número de levaduras y bacterias ácido lácticas de la bebida simbiótica funcional aceptable.	58
Tabla 19 – Rendimiento de biomasa húmeda (g) al adicionar concentración de jarabe de yacón respecto al tiempo de fermentación (3 repeticiones).....	71
Tabla 20 – Rendimiento de biomasa húmeda (%) al adicionar concentración de jarabe de yacón respecto al tiempo de fermentación (3 repeticiones).....	72
Tabla 21 – Resúmenes de análisis estadístico (ANOVA) de rendimiento de biomasa obtenido en la bebida simbiótica funcional formulada.....	72
Tabla 22 – Resultados de medición de pH al término de cada tiempo de fermentación con adición de 10, 12 y 15% jarabe de yacón (3 repeticiones)	73



Tabla 23 — Resumen de análisis estadístico (ANOVA) de la medición de pH obtenido en la bebida simbiótica funcional formulada.	74
Tabla 24 — Degustación con concentración de jarabe yacón al 10%	77
Tabla 25 — Degustación con concentración de jarabe yacón al 12%	77
Tabla 26 — Degustación con concentración de jarabe yacón al 15%	77
Tabla 27 — Rangos en la prueba de Krukall-Wallis	78
Tabla 28 — Recuento del número de levaduras y bacterias ácido lácticas en la muestra aceptable por dos repeticiones obtenida en la Universidad Nacional Agraria la Molina.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 — Estructura química de Fructooligosacáridos extraído de Kina (2016).....	17
Figura 2 — Elaboración artesanal de kéfir y conservación de gránulos extraído de Ferrari (2020).....	23
Figura 3 — Granos de kéfir recolectados (a) y granos de kéfir rejuvenecidos (b).....	39
Figura 4 — Jarabe de yacón con 66°Brix de concentración de azúcares.....	40
Figura 5 — Bebida simbiótica funcional con 12 horas de fermentación y concentraciones de jarabe de yacón 10, 12 y 15%.....	47
Figura 6 — Rendimiento de biomasa húmeda (g) en función a la concentración de jarabe de yacón y tiempo de fermentación.....	51
Figura 7 — Comportamiento de pH bebida simbiótica funcional en función de concentración de jarabe de yacón y tiempo de fermentación.....	54
Figura 8 — Consistencia de bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe yacón con 12 horas de fermentación con concentraciones de 10, 12 y 15% de jarabe de yacón, observado sin formación de fases.....	70
Figura 9 — Consistencia de bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe yacón con 18 horas de fermentación con concentraciones de 10, 12 y 15% de jarabe de yacón, observado con formación de fases.....	70
Figura 10 — Granos de kéfir 12h de fermentación luego de ser filtradas, correspondiente a concentraciones de 10, 12 y 15% de jarabe de yacón respectivamente listas para ser almacenadas o para ser usadas en nuevas fermentaciones.	71
Figura 11 — Tratamiento sin separación de fases correspondiente a 12h de fermentación para concentraciones de 10, 12 y 15% de jarabe de yacón, previamente acondicionada para la evaluación de los panelistas en laboratorio de Química de los Alimentos.....	76
Figura 12 — Estudiantes de la Escuela Académica Profesional Ingeniería Agroindustrial como panelistas en la evaluación de la aceptabilidad (dulzor) de la bebida simbiótica funcional.....	76



RESUMEN

Los productos simbióticos son combinaciones apropiadas de prebióticos y probióticos, los cuales pueden ejercer tanto un efecto prebiótico como probiótico. El objetivo de este trabajo fue formular una bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón. Para tal efecto se recolectó dos muestras de granos de kéfir proveniente de dos mercados diferentes de la ciudad de Cusco. Los granos de kéfir recolectados se mezclaron y se cultivaron en leche para tener una sola fuente de inóculo homogéneo. Seguidamente, fue elaborado el jarabe de yacón hasta alcanzar una concentración de 66°Brix. Posteriormente, se efectuaron los ensayos de fermentación en el medio de cultivo patrón, con tiempos de fermentación 12, 18 y 24h y concentraciones de jarabe de yacón 10, 12 y 15%, para determinar simultáneamente el tiempo de fermentación y concentración de jarabe de yacón de una bebida fermentada tipo kéfir. Resultó ser más apropiado un tiempo de fermentación de 12 horas y concentraciones de jarabe de yacón 10%, 12% y 15%. Se determinó el rendimiento de biomasa húmeda producido al término de cada tiempo de fermentación. Siendo el mayor rendimiento de biomasa húmeda a una concentración de jarabe de yacón 15%, pues a esta concentración y al cabo de 24 horas de fermentación, el rendimiento de biomasa fue el más alto. Seguidamente, fue identificado el tratamiento de fermentación más adecuado, tomando en consideración pH, rendimiento de biomasa y formación de fases o que presentaran características similares a la bebida láctea fermentada tipo kéfir. Esta a su vez fue sometida a una prueba de aceptabilidad de dulzor, utilizándose la escala hedónica de categoría 9. Donde la mayor aceptabilidad del dulzor correspondió para una concentración de jarabe de yacón 15% y 12 horas de fermentación. Finalmente, a la muestra de mayor aceptabilidad se determinó las características fisicoquímicas y microbiológicas, comparándose los resultados con las especificaciones de la norma internacional Codex STAN 243. 2003, norma del Codex para leches fermentadas. Los resultados para grasa (0,58%), proteína total (2,4%), acidez (2,5%), N° de levaduras ($4,9 \times 10^4$ UFC/g) y N° de bacterias acidolácticas (10×10^7 UFC/g) estuvieron dentro de lo establecido en la norma ($<10\%$, $\geq 2,7\%$, $\geq 0,6\%$, $\geq 10^4$ UFC/g y $\geq 10^7$ UFC/g, respectivamente) y con viabilidad de las bacterias acidolácticas a los dos días de almacenamiento en refrigeración dentro de lo propuesto por la ANVISA. Siendo la bebida simbiótica funcional formulada una alternativa a los productos simbióticos.

Palabras clave: *Aceptabilidad, biomasa, jarabe de yacón, granos de kéfir y simbiótico.*



ABSTRACT

Symbiotic products are appropriate combinations of prebiotics and probiotics, which can exert both a prebiotic and a probiotic effect. The objective of this work was to formulate a functional symbiotic drink with kefir grains and yacon syrup. For this purpose, two samples of kefir grains from two different markets in the city of Cusco were collected. The collected kefir grains were mixed and cultured in milk to have a single source of homogeneous inoculum. Next, the yacon syrup was elaborated until reaching a concentration of 66°Brix. Subsequently, the fermentation tests were carried out in the standard culture medium, with fermentation times of 12, 18 and 24h and concentrations of 10, 12 and 15% yacon syrup, to simultaneously determine the fermentation time and concentration of yacon syrup of a kefir-type fermented drink. It turned out to be more appropriate a fermentation time of 12 hours and concentrations of yacon syrup 10%, 12% and 15%. The yield of wet biomass produced at the end of each fermentation time was determined. Being the highest yield of wet biomass at a 15% yacon syrup concentration, since at this concentration and after 24 hours of fermentation, the biomass yield was the highest. Next, the most suitable fermentation treatment was identified, taking into consideration pH, biomass yield and phase formation or that presented similar characteristics to the kefir-type fermented milk drink. This in turn was subjected to a sweetness acceptability test, using the category 9 hedonic scale. Where the highest sweetness acceptability corresponded to a 15% yacon syrup concentration and 12 hours of fermentation. Finally, the physicochemical and microbiological characteristics of the sample with the highest acceptability were determined, comparing the results with the specifications of the international standard Codex STAN 243. 2003, Codex standard for fermented milk. The results for fat (0.58%), total protein (2.4%), acidity (2.5%), number of yeasts (4.9×10^4 CFU/g) and number of lactic acid bacteria (10×10^7 CFU/g) were within the norm ($<10\%$, $\geq 2.7\%$, $\geq 0.6\%$, $\geq 10^4$ CFU/g and $\geq 10^7$ CFU/g, respectively) and with viability of lactic acid bacteria at two days of refrigerated storage as proposed by ANVISA. Being the functional symbiotic drink formulated an alternative to symbiotic products.

Keywords: *Acceptability, Biomass, yacon syrup, kefir grains, probiotic and prebioti*



INTRODUCCIÓN

Los nuevos estilos de vida han provocado el abandono de determinados hábitos saludables de alimentación. Es en este contexto donde han surgido los alimentos funcionales como aquellos que proveen beneficios a la salud. Actualmente, se da gran importancia a la utilización de los alimentos funcionales para corregir las posibles disfunciones o alteraciones de la microbiota intestinal, mediante la utilización de agentes bioterapéuticos o simbióticos (prebióticos, probióticos y simbióticos) (TRECASTRO, y otros, 2015)

La combinación de probióticos con prebióticos se define como simbiótico. Un probiótico se conceptualiza como un microorganismo vivo que contribuye a la salud y bienestar del huésped manteniendo y mejorando su balance intestinal microbiano (MONAR, 2014), tal es el caso de los granos de kéfir que reúnen características probióticas. Estos granos se comportan biológicamente como organismos vivos. Crecen, se multiplican y transmiten sus características a las siguientes generaciones (ARÉVALO, y otros, 2008). Por otra parte, los prebióticos son ingredientes no digeribles en la dieta, que producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero (CORZO, y otros, 2015), tal es el caso del jarabe de yacón que contiene un alto contenido de fructooligosacáridos, que asegura una mejor salud del tracto gastrointestinal (CORZO, y otros, 2015) . Así pues, esta propuesta, mezcla simbiótica de granos de kéfir y jarabe de yacón podría reunir tales requerimientos.

Además, se sabe que la principal fuente de carbono para el crecimiento de la microbiota de granos de kéfir es la lactosa, se conoce que también pueden fermentar otros tipos de azúcares, dado que los granos de kéfir son una mezcla simbiótica de varios microorganismos, entre las que se encuentran la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que es capaz de fermentar sacarosa (ARÉVALO, y otros, 2008), también hay datos existentes sobre mayor crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en extracto de yacón. Se ha descrito el incremento de la acidez por esta bacteria y, en consecuencia, la disminución del pH del medio (VEGAS, y otros, 2013). Esto quiere decir que, cuando el pH de la leche disminuye hasta 4,6 se induce a una coagulación de las caseínas (ZIMMERMANN, y otros, 2010).

En la presente investigación se pretendió utilizar el jarabe de yacón como prebiótico. Sin embargo, también podría haberse comportado como sustrato. En otras palabras, el jarabe de yacón además de contener componente prebiótico, aporta azúcares libres fermentables, que bien



podrían incrementar el sustrato del medio de cultivo, es decir, ser aprovechados por la microflora de los granos de kéfir.

Por los motivos mencionados, lo que se persiguió en esta investigación es formular una bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón, encontrar simultáneamente el tiempo de fermentación y la concentración de jarabe de yacón. Luego determinar biomasa húmeda, pH, y aceptabilidad del dulzor.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

El kéfir, es un producto que resulta de la fermentación de leche con una mezcla de bacterias lácticas y levaduras de distintas especies, que reciben el nombre de granos de kéfir. Gracias a su doble fermentación, al kéfir se le atribuyen algunos beneficios para la salud, cuya ingesta mejora el funcionamiento del sistema digestivo (RUIZ, y otros, 2017). Cabe señalar que este producto procede de las montañas del Cáucaso donde su preparación consistía en almacenar la leche en odres acondicionados a partir de las pieles de las cabras, los cuales colgaban en la puerta de la casa. Desde entonces, se conservó por millones de años y el consumo fue frecuente por los campesinos del Cáucaso (OLIVO, y otros, 2017).

El sustrato más utilizado para los granos de kéfir es la leche de vaca, pero también se utilizan otros sustratos no lácteos como la miel, verduras, soja, te y jugos probados para adaptación de microorganismos de granos de kéfir en la producción de diferentes bebidas funcionales. Diversos estudios revelan que la composición de los granos de kéfir es muy compleja. Dado que varía de acuerdo al origen geográfico, del sustrato a utilizarse durante la fermentación, de la temperatura de incubación y de los métodos de elaboración (OLIVO, y otros, 2017).

La disminución del pH hasta 4,6 en las fermentaciones lácticas induce a la coagulación de la caseína (ZIMMERMANN, y otros, 2010). Esta situación también fue observada en ensayos preliminares del presente trabajo de investigación, formulación de una bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón, observándose formación de fases. Por un lado, los granos de kéfir al ser inoculados en un sustrato láctico pueden alcanzar hasta pH que oscila entre 4,0 - 4,5. Además, existen estudios que demuestran que la adición de concentrado de yacón con 50°Brix en una fermentación láctica (yogurt) reduce significativamente el tiempo de fermentación (incubación), aumentando los niveles de ácido láctico en el yogurt (PARRA, 2014). Esta tendencia se debe a la concentración de yacón que puede comportarse como prebiótico y así también como sustrato debido a que posee en su composición azúcares libres (sacarosa, fructosa, etc.) (Tabla 5), que bien pueden ser aprovechados por la microflora de los granos de kéfir.

Por otro lado, también fue observado en los ensayos preliminares desarrollado en laboratorio para la bebida simbiótica funcional, que el tiempo de fermentación con más de 24 horas de incubación, resultó en separación de fases, con mayor cantidad de suero y



acidez, evidenciándose que este tiempo fue excesivo. Por lo cual es necesario encontrar parámetros adecuados de formulación, de modo que la bebida simbiótica formulada este dentro de los límites permitidos por las normas establecidas para bebidas lácteas fermentadas tipo kéfir.

Las características sensoriales del kéfir son influenciadas por el tipo de leche utilizado durante el periodo de fermentación, tales como leche de cabra. Entre tanto, la adición de sustratos no lácteos también puede influir en el sabor, textura y olor de este producto. Además, las cualidades sanitarias adecuadas en el kéfir son de importancia debido a que pueden aportar presencia de coliformes (PRETELL, y otros, 2012). Las bacterias patógenas pueden sobrevivir a pH bajo y a temperaturas de refrigeración durante el almacenamiento por un tiempo significativo, existiendo la posibilidad de que, si contaminaran productos lácteos después de la pasteurización, podrían sobrevivir el tiempo necesario para infectar a alguna persona. Esto resalta la importancia de un buen manejo durante la producción y almacenamiento del kéfir.

Los estudios citados complementados con los ensayos preliminares realizados en el Laboratorio de Química de la UNAMBA nos conllevaron a proponer la formulación de una bebida simbiótica funcional usando granos de kéfir y jarabe de yacón.

1.2 Enunciado del Problema

1.2.1 Problema general

¿Es posible formular una bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cuál será la concentración adecuada de jarabe de yacón en la formulación de la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón?
- ¿Cuál será el tiempo de fermentación adecuado en la formulación de la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón?
- ¿Cuáles serán las características fisicoquímicas de la bebida simbiótica funcional formulada con granos de kéfir y jarabe de yacón?
- ¿Cuáles serán las características microbiológicas de la bebida simbiótica funcional formulada con granos de kéfir y jarabe de yacón?



- ¿Cuál será la aceptabilidad del dulzor de la bebida simbiótica funcional formulada con granos de kéfir y jarabe de yacón?

1.2.3 Justificación de la investigación

La población de ganado bovino en el Perú fue aproximadamente 5 156 044 en el año 2012 mayor en 14,7% a la población registrada en el censo agropecuario de 1994. Los bovinos de la raza Holstein representan el 10,3% de la población total de acuerdo al INEI-MINAG, 2012 citado por BENITES (2018). Los 10 419 bovinos Holstein existentes en la región Apurímac, cumplen un rol importante en la vida de las comunidades campesinas, por ser fuente de nutrientes al ser consumidos, fuente de ingresos económicos, y fuente de fertilizantes, cuero, entre otros, tal como sucede en el distrito de Tamburco – Abancay, donde la producción de leche es una de las actividades agropecuarias prioritarias para la sostenibilidad de los productores, al proveer leche a la empresa agroindustrial “Tambo Grande” (BENITES, 2018).

En las últimas décadas, a fin de proveer un producto más saludable, el mercado a puesto a disposición productos lácteos con adición de probióticos y prebióticos, tales como algunas leches, bebidas lácteas y leches fermentadas tipo kéfir, los cuales son vendidos exitosamente en varias partes del mundo. En materia de alimentos que contienen probióticos y prebióticos, el sector salud ha mostrado interés por estos alimentos orientándolos para mejoramiento general del tracto digestivo, disminución del colesterol sanguíneo y mejoramiento de las defensas del cuerpo (FERRARI, y otros, 2020). Se han atribuido al kéfir varios beneficios sobre la salud, incluyendo sus actividades antimicrobianas contra un rango de bacterias Gram positivas, hongos.

El yacón ha sido otro de los productos, cuyo consumo en el mercado se viene incrementado. PARRA (2014) sugiere que el jarabe de yacón promueve, entre otros aspectos, la restauración de la microflora intestinal, estimulando la formación de bacterias conocidas con el nombre bifidobacterias, permitiendo regular a otras que se encargan de la putrefacción de los residuos en el intestino. Además de lo citado anteriormente, el yacón es conocido por disminuir considerablemente el contenido de triglicéridos y aportar bajas calorías por su contenido de inulina.



En la región Apurímac la producción de yacón alcanzo 9 007 toneladas en el año 2013, disminuyendo respecto al año 2012 que era de 11 821 toneladas (MINAGRI, 2014), sin embargo, es escasamente consumido, no existiendo hábitos alimentares de consumo, no alcanzándose un nivel tecnológico adecuado para su aprovechamiento, de ahí la necesidad de impulsar su consumo y producción, proponiéndose nuevas alternativas de consumo, tal como la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón.



CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivos de la investigación

2.2.1 Objetivo general

Formular una bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón.

2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración adecuada de jarabe de yacón para la formulación de la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir.
- Determinar el tiempo de fermentación adecuado para la formulación de la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón.
- Determinar las características fisicoquímicas de la bebida simbiótica funcional formulada con granos de kéfir y jarabe de yacón.
- Determinar las características microbiológicas de la bebida simbiótica funcional formulada con granos de kéfir y jarabe de yacón.
- Evaluar el dulzor de la bebida simbiótica funcional formulada con granos de kéfir y jarabe de yacón.

2.2 Hipótesis de la investigación

2.2.3 Hipótesis general

Sí es posible formular una bebida simbiótica funcional con gránulos de kéfir y jarabe de yacón.

2.2.4 Hipótesis específicas

- La concentración de jarabe de yacón en la formulación de la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón influye en las características fisicoquímicas de la bebida láctea fermentada tipo kéfir.
- El tiempo de fermentación en la formulación de la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón influye en las características fisicoquímicas de la bebida láctea fermentada tipo kéfir.
- Las características fisicoquímicas de la bebida simbiótica funcional formulada con granos de kéfir y jarabe de yacón están dentro de los límites permitidos



por las normas establecidas para bebidas lácteas fermentadas tipo kéfir: proteína láctea min. 2,7%, grasa láctea < 10%, acidez valorable mín. 0,6%.

- Las características microbiológicas de la bebida simbiótica funcional formulada con granos de kéfir y jarabe de yacón están dentro de los límites permitidos por las normas establecidas para bebidas lácteas fermentadas tipo kéfir: levaduras, mín 10^4 UFC/g. y N° de bacterias acidolácticas 10×10^7 UFC/g
- La bebida simbiótica funcional formulada con granos de kéfir y jarabe de yacón presenta dulzor aceptable.

2.3 Operacionalización de variables

A continuación, en la Tabla 1 se detalla la descripción de la operacionalización de variables independientes y dependientes de una bebida simbiótica funcional.

Tabla 1 – Descripción de variables dependientes e independientes

Variables	Indicadores	Índices
	Variable independiente	
Concentración jarabe de yacón de la bebida simbiótica	10, 12, 15	%
Tiempo de fermentación de la bebida simbiótica	12, 18, 24	H
	Variable dependiente	
Atributo sensorial de la bebida simbiótica	Dulzor	Escala Hedónica
Rendimiento de la biomasa húmeda	Masa	%
pH de la bebida simbiótica	Ácido	
Composición proximal de la bebida simbiótica	Proteína y grasa	%
Acidez titulable de la bebida simbiótica	Ácido láctico	%
Caracterización microbiológica de la bebida simbiótica	Bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras	UFC/g

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1 Antecedentes

- a) Estudios realizados por (ARÉVALO, y otros, 2007), indican el estudio comparativo del efecto de las temperaturas, constante y variable, en la producción de biomasa proveniente de la microbiota de los granos de kéfir. En el cual se empleó inóculo de granos de kéfir a una concentración de 5% y de los cuales se dejó fermentar por 4 ciclos de fermentación a razón de 24 horas por cada ciclo, en condiciones de temperatura constante 24°C y temperatura variable 19 a 26°C. La evaluación reveló que no había diferencia significativa entre las temperaturas de fermentación constante y variable respecto al peso, es decir, la biomasa, también observó diferencias con respecto a la consistencia de los granos de kéfir en ambas temperaturas.
- b) RAMIREZ, y otros (2016), demostró la naturaleza compleja de los granos de kéfir. Para iniciar la fermentación se pesaron las concentraciones y se adicionaron en los frascos estériles de 100mL de leche de vaca, inmediatamente se colocaron en una estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A su vez se determinó la curva de crecimiento de los gránulos de kéfir, la biomasa en frascos independientes, a diferentes intervalos de tiempo (2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36 y 48h) con 10g de inóculo/L de leche como sustrato. Los resultados demostraron que no hubo fase de crecimiento exponencial y que la temperatura fue un factor regulador clave para la producción de biomasa a partir de leche con o sin suplementación.
- c) MARCHINI (2016) realizó un estudio exploratorio de las condiciones de fermentación del inóculo de kéfir. En el estudio estandarizó las condiciones de fermentación para la elaboración del kéfir, se sembró el inóculo en frascos individuales con 10 ml de leche para mantener constante la proporción de inóculo a lo largo del tiempo. Se realizaron diferentes tratamientos, considerando como variables la temperatura de incubación (25, 30 y 35°C) y la cantidad de fermento (10 y 20% m/m del inóculo). La incubación se realizó durante 24 horas y la fermentación se inhibió enfriando las muestras a 8°C. El proceso de fermentación fue monitoreado a 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 24h. A cada tiempo se midió pH y acidez del kéfir. Los resultados mostraron que el tiempo requerido para alcanzar la acidez de 1g de ácido láctico en 100g de producto a pH 4,4 fue 10 horas y con 20% (p/p) de inóculo en función de la temperatura de incubación.
- d) Estudios realizados por DALLA, y otros (2018) describen la evaluación sensorial de kéfir sabor fresa y ciruela. Para la obtención de la bebida láctea fermentada (kéfir) se



añadió aproximadamente 60g de granos de kéfir en 100mL de leche esterilizada (UHT). Inmediatamente después de la inoculación, la leche fue incubada a temperatura de 25°C por un periodo de 36 h a 48 h en frascos cubiertos con papel filtro. A continuación, la leche fermentada fue filtrada para la separación de los granos de kéfir. Esta leche fermentada fue utilizada para la obtención del kéfir sabor fresa y ciruela. El kéfir sabor fresa se obtuvo añadiendo 10% (p/v) de pulpa de fresa congelada, 10 a 12% (p/v) de azúcar y 0,1% (v/v) de esencia de fresa colorante rojo Ponceau. Las mejores formulaciones del kéfir sabor ciruela se compuso de la adición de 4 o 8% (p/v) de pulpa de ciruela en almíbar y 8 o 11% (p/v) de azúcar. Los resultados dieron una aceptación positiva de las formulaciones con relación al sabor del kéfir. Esta aceptación fue importante para divulgar el producto e incentivar su consumo.

- e) Estudios realizados por ARÉVALO, y otros (2008) determinaron simultáneamente el tiempo de fermentación y la concentración de inóculos requeridos en suero de leche, siendo el objetivo del estudio determinar el menor tiempo de fermentación con un máximo rendimiento de biomasa. Se utilizó 7 matraces conteniendo 200 ml de suero de leche y granos de kéfir, cuyas concentraciones fueron 2%, 3%, 4%, 5% y sucesivamente llegar hasta 8%. Se inició la fermentación con agitación moderada cada 12 horas, al mismo tiempo que se controló pH, densidad del medio de cultivo y, debido a que hubo hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa durante el proceso de fermentación, también se cuantificó azúcares totales. Los resultados dieron que la concentración de inóculo óptimo correspondió a un tiempo de fermentación óptimo de 48 horas.
- f) También se considera estudios realizados por PARRA (2014) donde estudió el efecto de la adición de concentrado de yacón (*Smallanthus Sonchifolius*) en las características fisicoquímicas, microbiológicas, proximales, y sensoriales de yogur durante el almacenamiento bajo refrigeración. Se manejaron dos tratamientos, uno de ellos contenía concentrado de yacón y la otra sacarosa. Durante 30 días de almacenamiento bajo refrigeración, se realizó los análisis correspondientes. Los resultados mostraron que la adición de concentrado de yacón presenta efecto en el pH (disminuyendo) y en la acidez (aumentando) y respecto a la evaluación sensorial mostró aceptabilidad en promedio 4,3 sobre 5 para el yogur con concentrado de yacón.

3.2 Marco teórico

3.2.1 Alimentos funcionales

De acuerdo a la narración de TRECASTRO, y otros (2015). La idea de los alimentos funcionales fue desarrollada en Japón durante la década de los 80, en respuesta a una necesidad de reducir el alto costo que suponían los seguros de salud en una población



cada vez mayor de edad. Japón es el único país que ha aprobado un proceso regulador específico para la aprobación de alimentos funcionales conocidos como FOSHU (alimentos de uso específico para la salud). Actualmente, existen más de 100 productos con licencia FOSHU, los cuales llevan un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar de ese país.

El concepto de alimento funcional emergió con el enfoque de la búsqueda de una nutrición óptima y personalizada, enfocada a la promoción integral de la salud, la reducción del riesgo y prevención de ciertas enfermedades, hasta el momento no goza todavía de consenso científico. Los efectos beneficiosos de muchos alimentos funcionales son, por el momento, especulativos, aunque empiezan a consolidarse evidencias científicas sobre las propiedades de ciertos grupos de alimentos funcionales. De hecho, la dieta mediterránea proporciona numerosos y variados alimentos funcionales: frutas, verduras, legumbres, hortalizas, pescados, lácteos fermentados, aceite de oliva virgen y, en cantidades moderadas, frutos secos (TRECASTRO, y otros, 2015).

Así pues, el concepto de los alimentos funcionales ha estado rodeado de controversias que conviene recordar algunas de ellas que son de carácter conceptual. Desde un inicio los alimentos funcionales formaban parte de una estrategia para mejorar la calidad de vida, especialmente de la población anciana, y muy en la línea del marketing. Posteriormente, pasaron a formar parte de los “alimentos fortificados con ingredientes capaces de provocar efectos beneficiosos para la salud”. Sin embargo, no debería confundirse con los alimentos enriquecidos, suplementados o propiamente fortificados, ya que en estos últimos la adición de nutrientes busca aumentar su valor nutritivo, pero va más allá, en el sentido de pretender mejorar la salud de la población a la que se destina, excepto en las consecuencias que se derivan de una mejor adecuación de las necesidades nutritivas, a pesar de todo, la frontera entre grupos de alimentos no siempre está bien definida (VALENZUELA, y otros, 2014).

Asimismo, existe otra definición del alimento funcional según la IFJC (Consejo Internacional de Información sobre Alimentos) todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, además de aportar un valor nutritivo puede ser capaz de producir demostrados efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de un buena salud física y mental, en la reducción del riesgo de enfermedades crónico degenerativas, además de sus funciones básicas (BERNAL, y otros, 2017).



Dicho de otra manera, el concepto general es que son ingredientes alimenticios cuyo consumo además de una nutrición básica, genera beneficios para la salud y/o reduce el riesgo y previene algunas enfermedades. Un alimento funcional puede ser un macronutriente con un efecto fisiológico específico o un micronutriente esencial, pero también puede ser un componente alimenticio que, aunque no tenga un alto valor nutritivo o no sea esencial, su consumo logre la modulación de alguna función en el organismo que reduzca el riesgo de enfermedad, como es el caso de los prebióticos y algunos microorganismos viables (VALENZUELA, y otros, 2014).

3.2.2 Alimentos simbióticos

Los alimentos simbióticos son aquellos que en su composición incluyen a los probióticos y prebióticos, la cual beneficia al huésped mediante el aumento de la sobrevivencia e implementación de los microorganismos vivos de los suplementos dietéticos en el sistema gastrointestinal (GALLINA, y otros, 2012).

3.2.3 Prebióticos

La definición de prebióticos, por su utilidad y relevancia, ha sido sometida a diferentes modificaciones por la comunidad científica, las agencias reguladoras, la industria alimentaria y los profesionales de la salud. Según Gibson y Roberfroid investigadores que propusieron por primera vez la definición de prebiótico en la que indicaron que: “Es un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o un limitado número de especies bacterianas en el cólon, y que por lo tanto mejora la salud” (CASTAÑEDA, 2018).

Posteriormente, diferentes organismos tales como la FAO de las Naciones Unidas y la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP siglas del inglés) definieron a los prebióticos como: “ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo” (CASTAÑEDA, 2018).

3.2.3.1 Efecto y rasgos de los prebióticos

Los prebióticos tienen que ver con el incremento de las bacterias intestinales intrínsecas y proporcionan por esta vía una estrategia alternativa para modificar eficazmente el ecosistema intestinal. De acuerdo a CASTAÑEDA (2018) se han considerado algunas condiciones para ser usados como prebióticos o deben de cumplir con las siguientes:



- Producto natural no hidrolizado, resistente al ácido clorídrico no absorbible por las enzimas en el tracto digestivo (esófago, estómago y duodeno).
- Capaz de modificar la composición de la microbiota intestinal del colon tras ser selectivamente fermentada por una o varias bacterias.
- Estimulación selectiva de bacterias intestinales e inducción de beneficios para la salud.

3.2.3.2 Carbohidratos no digeribles

Los carbohidratos no digeribles son clasificados en colónicos y prebióticos (Tabla 2). Los primeros, son carbohidratos que llegan al colon directamente, sirven como sustrato para los microorganismos que lo habitan generando energía, sustratos metabólicos y micronutrientes para el hospedador, dentro de este grupo se encuentran los polisacáridos estructurales de plantas, tales como pectinas, hemicelulosas o celulosa, etc. Mientras que los prebióticos poseen, además de las características mencionadas, “efecto bifidogénico” mediante la estimulación selectiva del crecimiento de especies bacterianas de *Lactobacillus* y *bifidum* de la microbiota del colon (CASTAÑEDA, 2018).

Tabla 2 – Clasificación de los carbohidratos no digeribles

Carbohidratos no Digeribles	Denominación de Carbohidratos no Digeribles
Ingredientes colónicos (polisacáridos estructurales en las plantas)	Pectinas.
	Hemicelulas o celulosa.
	Gomas.
	Algunos oligosacáridos derivados de soja.
	Glucooligosacáridos.
	Arabinoooligosacáridos.
Prebióticos	Fructanos de tipo inulina
	Fructooligosacáridos (FOS)
	Galactooligosacáridos (GOS)
	Lactulosa.
	Oligosacáridos de la leche humana.

Extraído de Castañeda (2018).



3.2.3.3 Yacón

Se ha demostrado experimentalmente por PARRA (2014) la utilización del yacón como ingrediente prebiótico en combinaciones simbióticas, fundamentalmente por el FOS (sub-grupo de la inulina) que causa en el cólon una estimulación selectiva en el hospedero. Por otro lado, es conocido que el yacón (*Smallanthus sonchifolius*), es una planta con raíces tuberosas de reserva, fusiformes, con sabor dulce principalmente por el contenido de FOS (fructooligosacárido) e inulina y algunos azúcares libres (fructosa, glucosa, sacarosa, etc.), aunque también contiene proteínas, potasio, calcio y otras sustancias en cantidades pequeñas. Tales raíces han sido empleadas tradicionalmente por la población como alimento y supuestas propiedades medicinales. Sin embargo, es relativamente reciente la posibilidad de su empleo como prebiótico, lo cual podría significar una nueva alternativa con ahorros en recursos de salud para problemas digestivos en las cuales los prebióticos esten indicados (RAMOS, 2016).

a) Producción del yacón

En casi todos los departamentos del Perú se siembra yacón, siendo Amazonas, Cajamarca, Oxapampa, Huánuco y Puno los lugares con mayor área sembrada. En el Perú, el área estimada de siembra con fines comerciales en el 2012 fue de 600 Ha, manteniéndose en la actualidad. En Bolivia y Ecuador su cultivo es menor y se destina principalmente al autoconsumo. En Argentina se siembra sólo en las provincias nortenas de Jujuy y Salta. Fuera de los Andes, Brasil (Sao Paulo) y Japón (con 100 ha) son los países con mayor área de cultivo. Sin embargo, en la Tabla 3 se puede observar la producción de yacón en el departamento del Apurímac (RAMOS, 2016).

Tabla 3 – Producción de yacón en el departamento de Apurímac

Año	Producción (T.M.)
2000	188
2001	200
2002	250
2003	240
2004	220
2005	300
2006	252
2007	267
2008	282
2009	297
2010	312
2011	327
2012	342
2013	356
2014	371

Extraído de Ramos (2018)

b) Composición de la raíz tuberosa

El yacón es representativo porque es una de las raíces comestibles con mayor contenido de agua, y se divide en dos partes: raíz y hojas que tienen varias composiciones. Las raíces del yacón tienen entre el 80% y 90% del peso fresco, es el peso que tiene una muestra con humedad. En cuanto al peso seco, peso de la muestra después de secarse a 105°C, la raíz está constituida por 90% de carbohidratos, de estos entre el 50% y 70% son Fructooligosacaridos (FOS) e inulina y el resto son fructosa, glucosa y sacarosa. De igual forma las raíces también están compuestas por potasio, compuestos polifenólicos derivados del ácido cafeico, sustancias antioxidantes como el ácido clorogénico y triptófano y varias fitoalexinas con actividad fungicida. El contenido, lípidos, vitaminas y minerales es bastante bajo (CONTRERAS , y otros, 2018).

c) Fructooligosacaridos

El yacón presenta en su composición concentración significativa de Fructooligosacaridos (FOS). Los FOS son reconocidos como “fibra

dietética y como prebióticos y se define como un azúcar no digerible en el tracto gastrointestinal e inerte para el ser humano, que al ser ingerido sirve como alimento para favorecer el crecimiento diferencial en el intestino de bacterias probióticas, mejorando así el balance intestinal”. Con base a lo anterior el consumo de yacón genera efectos positivos para la salud: (a) tiene una gran repercusión en la salud gastrointestinal por que su consumo genera la disminución del pH del cólon impidiendo la presencia de las bacterias perjudiciales. Además tiene un efecto de prevención en el cáncer de cólon pues diluye los cancerígenos fecales y (b) el consumo de yacón, a través de los fructooligosacáridos reduce el consumo calórico al ser un tipo de azúcar de baja digestibilidad, reduciendo de esta manera la propensión a la obesidad y siendo una alternativa de consumo para los diabéticos.

Algunas investigaciones mencionan como PARRA (2014) que las raíces del yacón contienen inulina como componente principal, estas referencias no son exactas ya que el yacón también contiene FOS. La diferencia se encuentra en el número de las moléculas de fructosa que tiene estas cadenas en la inulina, estas varían de 2 a 60 (inulina) en cuanto a FOS presentan cadenas menores y el número varía de 2 a 10. Esto significa que los FOS podrían ser considerados como un subgrupo de la inulina, mencionado por algunos autores como FOS de tipo inulina para referirse con mayor precisión a la naturaleza de estos azúcares (RAMOS, 2016).

Se observa en la Figura 1 que la estructura química del resto de FOS es similar a 1-cetosa, sólo varía en el número de moléculas de fructosa que pueden llegar a polimerizar (hasta 10 unidades) (KINA, 2016).



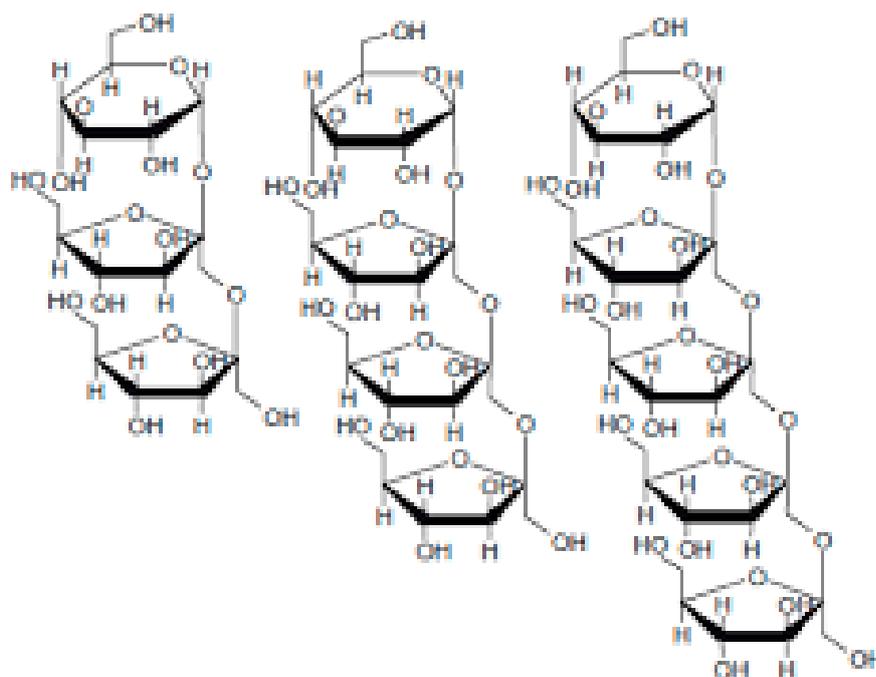


Figura 1 — Estructura química de Fructooligosacáridos extraído de Kina (2016).

d) Diferencias entre inulina y FOS

Es importante distinguir claramente la diferencia que existe entre los conceptos de inulina y FOS ya que las propiedades físicas y sus aplicaciones en procesos de la industria alimentaria son bastante diferentes. La inulina casi no tiene sabor dulce, su consistencia especial y su baja solubilidad relativa en agua lo convierten en su sustituto excelente de la grasa para la elaboración de varios tipos de alimentos, como helados y postres. En cambio, los FOS son muy solubles en agua, tienen un ligero sabor dulce (entre 30 a 50% del poder edulcorante del azúcar de mesa o sacarosa) y eventualmente pueden ser utilizados como sustitos hipocalóricos del azúcar común. A pesar de ello, la inulina y los FOS generan casi el mismo efecto fisiológico en las personas que los consumen: proporcionan tan solo la cuarta parte del valor calórico de los carbohidratos comunes, son reconocidos como un tipo de fibra dietética y se emplean como insumos para la elaboración de alimentos funcionales o nutraceuticos (RAMOS, 2016).

El yacón ha sido reportado como buena fuente de fenol oxidasa, que cataliza la oxidación de compuestos fenólicos a quinonas, después de la polimerización, tienen los pigmentos típicos, conocido como oxidación enzimática de color marrón o negro en frutas y hortalizas (RAMOS, 2016), es importante tener en cuenta la sub-capa de la cáscara cuando se

estudia el proceso de extracción yacón porque es esta parte de la raíz que se centran taninos y polifenoles. Durante el procesamiento de pelado de yacón, células se rompen y las membranas, los polifenoles y los taninos son disponibles para mezclarse con otros componentes, enzimas especialmente citoplasmáticos, que causan un proceso conocido como oxidación enzimática y se puede evidenciar durante la elaboración de jarabe de yacón, y desde luego la piel se vuelve rápidamente oscuro cuando se expone al aire (RAMOS, 2016).

Esta oxidación se lleva a cabo en presencia de oxígeno libre, oscureciendo rápidamente la superficie de las raíces tuberosas del yacón al realizar el proceso de pelado, dañando su apariencia y sus productos. Desde el punto de vista práctico, el control del pardeamiento enzimático es generalmente limitada a la inhibición de la enzima porque la polifenol oxidasa y enzima peroxidasas son responsables de la reacción de pardeamiento. Entre los métodos propuestos para prevenir la oxidación incluyen: deshidratación, el almacenamiento y tratamiento a baja temperatura de calor, utilizando antioxidantes, la eliminación de oxígeno del medio, entre otros (RAMOS, 2016).

Tabla 4 – Composición química de yacón por 1 kg de raíz tuberosa fresca

Carbohidratos	Promedio
Materia seca (g)	115
Fructanos (g)	62
Glucosa (g)	3,4
Fructosa (g)	8,5
Sucrosa (g)	14
Total de carbohidratos (g)	106
Proteína (g)	3,7
Fibra (g)	3,6
Grasa (mg)	244
Cenizas (mg)	5027
Calcio (mg)	87
Fósforo (mg)	240
Potasio (mg)	2282

Extraído de Ramos (2018)

e) Jarabe de yacón

El jarabe de yacón es un concentrado denso y dulce que se obtiene al evaporar suficiente agua contenido en el jugo del yacón luego de ser pulpeado, de tal modo que la concentración de sólidos solubles (azúcar) se eleve hasta un valor aproximado de 70%. Para evaporar el agua del jugo se debe usar un recipiente de superficie amplia en el que se vierte el jugo de yacón. La olla industrial es puesta en una fuente de calor (puede ser la llama de una cocina) y se deja evaporar el agua hasta conseguir la concentración de azúcares que se desea alcanzar. Es preferible contar con un refractómetro para tener un control permanente del contenido de azúcares en el jarabe a medida que se va evaporando. Durante el proceso de evaporación se deben realizar varios filtrados con la finalidad de eliminar los sólidos insolubles en el jarabe y obtener finalmente un producto de mejor apariencia y calidad. Para prevenir el desarrollo de microorganismos en el producto envasado, este debe hacerse a una temperatura superior a 85°C, la eficacia de conversión de

raíces a jarabe 12:1 (peso de raíces: peso de jarabe) (MUÑOZ, 2010). El producto resultante es un jarabe concentrado rico en fructooligosacáridos presentado como jarabe de yacón, dulce y ligeramente ácido. Su composición se presenta en la Tabla 5.

El jarabe de yacón tiene de 40 a 50% de FOS se obtiene al concentrar el jugo de las raíces de yacón. Este producto puede ser considerado como nutracéutico debido al alto contenido de componentes prebióticos, además el jarabe de yacón puede utilizarse como un edulcorante para ensaladas de frutas, jugos, bebidas calientes y postres, entre otros. El jarabe de yacón tiene características similares a otros productos como la miel, la caña de azúcar, la miel de chancaca y miel de maple resaltando su bajo valor calórico a comparación de los productos mencionados (MEJÍA, 2015).

Tabla 5 — Composición química de g/100g de jarabe de yacón

Característica	Unidad	Variedad blanca		Variedad morada	
		Base húmeda	Base seca	Base húmeda	Base seca
Agua	G	30,0	0,0	30,0	0,0
Fructooligosacáridos	G	44,6	63,7	44,9	
Sacarosa	G	12,1	17,3	9,24	13,2
Glucosa	G	9,0	12,86	7,78	11,11
Fructosa	G	4,29	6,13	8,03	11,47
Ácido ascórbico	Mg	1 624	2 320	1 568	2 240

Extraída de Muñoz (2010)

3.2.4 Probiótico

El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos del colon (VALENZUELA, y otros, 2014).

La palabra “probiótico” deriva etimológicamente del griego “por la vida”. La OMS define los probióticos como “microorganismos vivos que, al ser suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo del huésped”



(VALENZUELA, y otros, 2014). También la FAO (Food and Agriculture Administration), en tanto, los define como “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas”.

Los probióticos son microorganismos vivos que pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos, y suplementos dietéticos. Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las usadas más comúnmente como probióticos, pero la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *E. coli* y *Bacillus* también son utilizados como probióticos (GARCIA , y otros, 2015)

3.2.4.1 Kéfir

El kéfir es una bebida fermentada viscosa, de sabor ácido y levemente efervescente, que se produce artesanalmente a partir de la fermentación de la leche con granos de kéfir. Históricamente, el kéfir ha sido vinculado con un estado saludable de quienes lo consumen. De hecho, el nombre kéfir deriva de la palabra eslava “keif” que significa “bienestar” o “vivir bien”. Es originario de las montañas del Cáucaso, y a las características de los granos de kéfir han sido transmitidos de generación en generación desde hace más de 4 000 años. Se cree que los primeros granos de kéfir se originaron como consecuencia del almacenamiento de la leche en bolsas hechas de piel o estómago de los rumiantes. Sea cual sea el origen, lo más probable es que se hayan originado en distintos lugares a lo largo de la historia y se hayan diseminado de forma tal que hoy en día se encuentran distribuidos en todo el mundo (FERRARI, y otros, 2020).

El kéfir se diferencia de otras leches fermentadas por las características particulares del *starter*, o “cultivo iniciador”, utilizado para su producción. Tanto el yogurt, viili (leche fermentada nórdica) y otras leches fermentadas tradicionales, se obtienen por inoculación de la leche fresca con una muestra de leche fermentada previamente para obtener una mayor cantidad de producto. Por el contrario, la producción artesanal de kéfir requiere directamente la inoculación de la leche fresca con los granos de kéfir. Esto se debe a la interacción simbiótica entre los microorganismos de granos de kéfir que es fundamental para dar lugar a una leche fermentada que tiene una diversidad microbiana diferente. De esa manera, el uso del mismo kéfir dará lugar a un producto con propiedades completamente diferentes. Una



vez inoculados los granos de kéfir en la leche y dadas las condiciones de temperatura adecuadas, las bacterias y levaduras presentes en los granos comienzan el proceso de fermentación durante el cual algunos de los microorganismos pasan a la leche, dando lugar a un incremento en el número microorganismos viables en la leche, acompañado de la producción de diferentes metabolitos bioactivos tales como ácido láctico, péptidos bioactivos, exopolisacáridos y bacteriocidas. Al finalizar la fermentación, los granos de kéfir son removidos o separados por medio del proceso de filtración, de manera tal que pueden ser inmediatamente utilizados para una nueva fermentación o almacenados en condiciones adecuadas. Con cada fermentación, los granos incrementan su tamaño y pueden dar lugar a nuevos granos con las mismas características que los originales. Este incremento de biomasa, que puede llegar a ser de hasta 2% en cada replique o subcultivo, es consecuencia del aumento en el número de microorganismos y de la producción de kefiran y proteínas que componen la matriz dónde se encuentran asociados los microorganismos. Cuando no son utilizados para la elaboración de kéfir, los granos deben ser conservados de manera adecuada, es decir, en refrigeración o cualquier otro método de conservación, ya que su actividad depende de la viabilidad de los microorganismos (FERRARI, y otros, 2020).

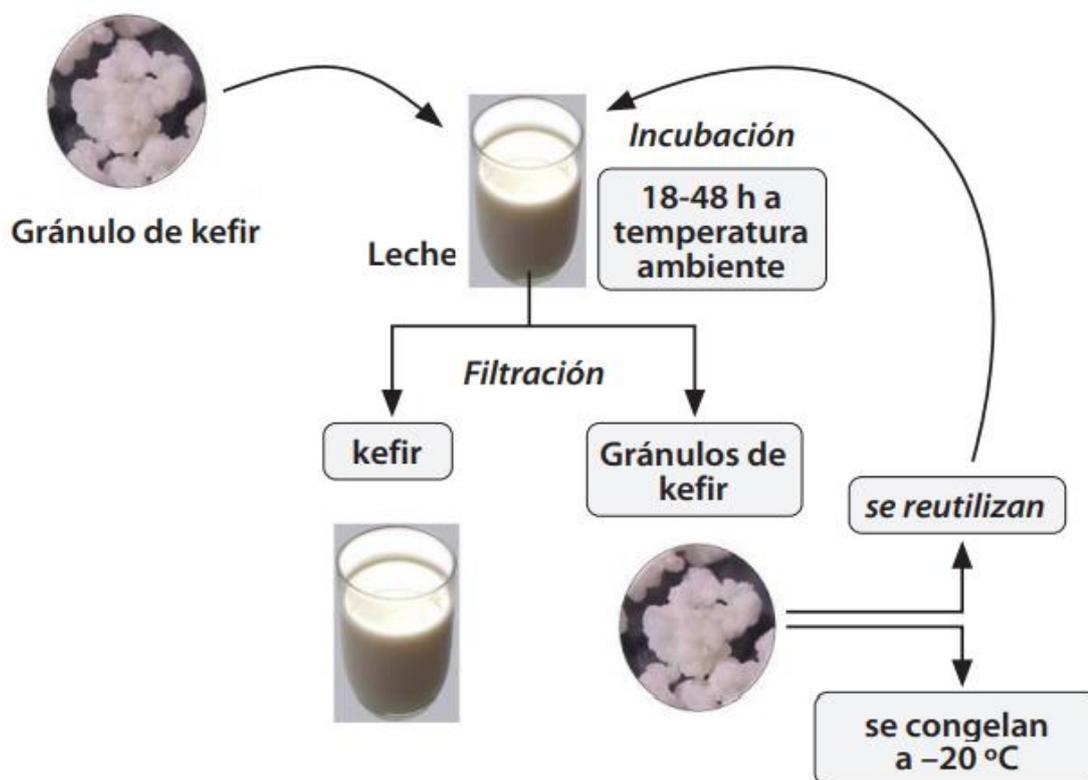


Figura 2 — Elaboración artesanal de kéfir y conservación de gránulos extraído de Ferrari (2020).

3.2.4.2 Granos de kéfir

Los granos de kéfir son racimos de los microorganismos ligados por una matriz de polisacáridos. Los granos incluyen sobre toda las bacterias de ácido láctico y las levaduras, así como bacterias del ácido acético y posiblemente otros microorganismos.

Los granos contienen un equilibrio relativamente estable y específico de bacterias, levaduras y algunas veces de hongos, que existen en un lazo simbiótico complejo. Los granos se asemejan a floretes pequeños de la coliflor, elásticos y cada grano es 3 a 20 milímetros de diámetro. Algunos pueden presentar formas laminares, con un lado liso y otro rugoso, enrolladas o globosas (RUIZ, y otros, 2017).

Estos granos son láminas compuestas en su mayor parte por un material polisacárido, consistente, que se denomina kefirán, que se pliega sobre sí mismo para producir unas estructuras esféricas que se parecen a las florecillas de la coliflor. La parte externa de las láminas es lisa y está poblada por lactobacilos, mientras que la parte interna de las mismas, más rugosa,

contiene una población mixta de levaduras y bacterias ácido lácticas (ARÉVALO, y otros, 2008).

Se ha reportado que los microorganismos presentan un arreglo especial en los granos. Por microscopía electrónica se observaron en el lado liso de las laminillas únicamente bacilos cortos, y en el lado rugoso una mezcla de bacilos y levaduras. La parte central del grano está constituida por proteínas y carbohidratos resultantes de la degradación de la biomasa. Los microorganismos que se encuentran en la parte central de los granos tienen viabilidad baja por tener poco contacto con el medio y se piensa que son los responsables de la producción del polímero (GARCIA , y otros, 2015).

3.2.4.3 Microflora de los granos de kéfir

La microflora básica de los granos de kéfir están compuestas por bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas, levaduras y en algunas ocasiones por hongos. Su distribución en los diferentes estratos de los granos de kéfir, han sido demostrados en diferentes trabajos.

La compleja microbiota de los granos de kéfir constituye un reservorio natural de cepas seguras y potencialmente probióticas para la salud y también saber de que manera interactúan. Es importante destacar que la composición microbiana de los granos de kéfir difiere de la encontrada en la leche fermentada que viene a ser el kéfir (FERRARI, y otros, 2020).

El género *Lactobacillus* es el más abundante en los granos de kéfir que son de distintos orígenes, siendo *L. kefiranofaciens*, *L. kefiri* y *L. parakefiri* las especies más representativas. Otras especies de lactobacilos encontradas en los granos de kéfir incluyen *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* y *L. plantarum*. y del mismo modo, en el kéfir se observa una predominancia de la familia *Streptococcaceae* y los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Acetobacter*. Se ha evidenciado además que la diversidad de especies bacterianas presentes en el kéfir es menor a la encontrada en los granos de kéfir correspondiente (GARCIA , y otros, 2015).

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que las especies que predominan en el kéfir pueden verse modificadas por el tiempo de fermentación. En las primeras horas de fermentación predomina *L. kefiranofaciens*, mientras que en etapas tardías se observa una prevalencia del género *Leuconostoc*. En cuanto a las levaduras, más de 23 especies han sido identificadas formando

parte de la microbiota de los granos de kéfir; siendo *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kéfir* y *Kluyveromyces marxianus* las especies predominantes. Otras especies encontradas incluyen *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Kazachastania aerobia*, *Lachanceae meyersii*, *Yarrowia lipolytica* y *Kazachastabia unispora* (FERRARI, y otros, 2020).

Tabla 6 – Especies más frecuente en los granos de kéfir

Género	Especies más Frecuentes	Características
LACTOBACILOS	<i>Lb. Brevis</i> , <i>Lb. Kéfir</i>	Heterofermentativas, predominantes en la leche fermentada
	<i>Lb. Casei</i> , <i>Lb. paracasei sp. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii sp. Bulgaricus</i> , <i>Lb kéfiranofaciens</i> .	Predomina en los granos de kéfir.
LACTOCOCOS	<i>Lc. Lactis sp. lactis</i> , <i>Lc. lactis sp. lactis biovar diacetylactis</i> , <i>Lc. Lactis sp. cremoris</i>	Acidifica rápidamente durante las primeras horas de fermentación.
STREPTOCOCOS	<i>S. thermophilus</i>	Raramente encontrado.
LEUCONOSTOC	<i>Ln. Mesenteroides sp. mesenteroides</i> , <i>Ln. mesenteroides sp. dextranicum</i> , <i>Ln. mesenteroides sp. cremosis</i> , <i>Ln. Lactis</i>	Contribuye al sabor del kéfir
ACETOBACTER	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Acetobacter rasaen</i> .	Su rol principal es mantener en simbiosis la microflora de los granos de kéfir. Incrementa la viscosidad del kéfir.

Extraído de Ruiz *et al.* (2017)

a) *Lactobacillus brevis*

Se utiliza como starter mesófilo, en combinación con otros microorganismos en la elaboración de kéfir. Colonias generalmente rugosas y planas, pueden ser translucidas. Generalmente no pigmentadas, aunque algunas cepas pueden producir colonias de color naranja a rojo. Crece a 15°C, pero no a 45°C (FERRARI, y otros, 2020).

b) *Lactobacillus bulgaricus*

Utilizado en combinación con otros microorganismos en los starters destinados a la elaboración del “yogurt” y algunos quesos como los del tipo suizo e italiano, tal como el queso Granna por ejemplo. También se le menciona como componente de los *granos de kéfir*. Produce ácido D (-) láctico. Produce amoniaco a partir de arginina. Es muy semejante al *Lactobacillus lactis*; pero se diferencia en que no tiene capacidad para fermentar tantos azúcares. Pueden fermentar la lactosa y celobiosa, pero no la amígdalina, maltosa o manitol. Requiere algunas vitaminas y aminoácidos como factores de crecimiento (Robinson, 1987 citado por Arévalo & Arias, 2008).

c) *Lactobacillus acidophilus*

Starter termófilo, se emplea en la producción de leches acidas y con starters mesófilos, en la elaboración de *kéfir*. Colonias habitualmente rugosas, sin pigmentación característica. No posee gránulos metacromáticos. Pueden fermentar la amígdala, celobiosa, lactosa, salicina y sacarosa, pero no el manitol. Produce compuestos antimicrobianos como acidofilina y acidolina que son activos contra una gran diversidad de microorganismos Gram positivos y negativos. Requiere algunas vitaminas y aminoácidos como factores de crecimiento temperatura optima de crecimiento 35–38 °C (Cáceres y Gotteland, 2010).

d) *Lactobacillus casei*

Starter mesófilo, se utiliza en la elaboración del “yacult”. También se puede aislar de la leche y productos lácteos como el kéfir. Las colonias pueden de color blanco o amarillo claro. Pueden crecer a 15°C, pero no a 45°C. Fermentan la lactosa, sacarosa, salina, manitol y sorbosa; pero no la xilosa. No produce amoniaco a partir de la arginina (Cáceres y Gotteland, 2010).

e) *Lactobacillus plantarum*

Microorganismo que interviene en el proceso de maduración de algunos quesos. Se aísla de los productos lácteos, como el kéfir y ensilados. Son colonias blancas, pero en ocasiones de color amarillo claro. Algunas cepas son móviles. Produce ácido D y L- láctico, pero no amoniaco a partir de arginina. Fermenta la lactosa, sacarosa, celobiosa, manitol y salicina. Esta especie se diferencia de *lactobacillus casei*, en que



fermenta la melobiosa y rafinosa (ROBINSON, 1987). La temperatura óptima de este lactobacilo y de otros microorganismos productores de ácido láctico es de 26,7°C a 37,6°C ((ALVAREZ, y otros, 2008)

f) *Leuconostoc mesenteroides*

Se encuentra en la leche y productos lácteos, soluciones azucaradas viscosas, frutas y vegetales. Algunas cepas producen dextrano que se puede utilizar como estabilizador en mezclas de helados.

Habitualmente produce un limo de dextrano característico, la temperatura entre 20°C y 25°C favorecen la formación de dextrano. Algunas cepas, particularmente las de origen lácteo, producen poco dextrano. No soportan temperatura de 55°C durante 30 minutos, aunque los cultivos formadores de limo, en soluciones azucaradas, son capaces de sobrevivir a 80 – 85°C. Crecen a temperatura entre 10°C y 37°C. La temperatura óptima está entre 20 y 30°C (MAGO, y otros, 2015).

g) *Leuconostoc cremosis*

Starter mesófilo utilizado en combinación con otros microorganismos en la elaboración de quesos “cottage” y cremosos, mantequilla madurada y “Quarg”. No produce dextrano. Tampoco produce ácido a partir de la arabinosa, sacarosa o treolosa. Produce ácido acético a partir de citrato. Se puede adicionar al queso “cottage” para evitar las alteraciones producidas por *Pseudomonas* formadoras de limo. Se le ha reportado presente en la microbiota de los granos de kéfir. Se caracteriza por tener la capacidad de fermentación limitada y necesidades complejas en cuanto a factores de crecimiento. Puede crecer en un rango de temperatura entre 10°C y 30°C, siendo su temperatura óptima entre 18°C y 25°C (CICOTELLO, 2016).

h) *Streptococcus thermophilus*

Como habidad se reporta la leche y productos lácteos, en alimentos y materiales provenientes de plantas y suelos, se le utiliza como fermento arrancador o “Starter” en la industria quesera durante la manufactura de quesos frescos, madurados y también de pasta cocida, a través de siembras directas. La temperatura óptima de crecimiento es entre 40°C y 45°C, pero puede hacerlo hasta 50°C (BLANCO, 2015).

Son homofermentativo, no toleran más de 4% de sal. Se sabe que hidrolizan la lactosa mediante una α – galactosidasa, a galactosa y

glucosa; que posteriormente transformar en ácido láctico L (+) por vía Embden Meyorot Parnas (EMP). También fermentan fructosa y sacarosa. Finalmente, son también responsables del aroma agradable del producto, por la fermentación de compuestos carbonilo tales como acetaldehído y diacetilo (BLANCO, 2015).

i) *Streptococcus lactis*

Fermenta la glucosa formado principalmente ácido láctico dextrógiro. Es homofermentativo y catalasa negativa. Se utilizó solo o en combinación con otras especies para la elaboración de quesos de pasta dura, como por ejemplo el queso (BLANCO, 2015).

j) *Saccharomyces cerevisiae*

Como quiera que, la levadura que se utiliza en la elaboración de la cerveza, *Saccharomyces cerevisiae* es incapaz de fermentar el almidón, la primera fase de la elaboración de cualquier bebida alcohólica a partir de materias amiláceas es la conversión del almidón en azúcares susceptibles de ser fermentados. Es la levadura que con mayor frecuencia se encuentra en las bebidas y en los alimentos fermentados que se elaboran en base de frutas y hortalizas. Todas las cepas fermentan la glucosa y algunas fermentan otros carbohidratos asociados a las plantas tales como la sacarosa, la maltosa y la rafinosa, pero ninguna es capaz de fermentar la lactosa de procedencia animal (SUÁREZ, y otros, 2016)

k) *Kluyveromyces fragilis*

Se ha aislado del yogurt y está asociado con la elaboración de kéfir y kumis. En caldo extracto de malta (3 días a 28°C) las células son entre elipsoidal y cilíndrica y se pueden presentar aisladas, en pares o cadenas cortos. Se observan diferentes grados de pseudomicelio. Ascosporas tienen forma arriñonada u oblonga con extremos obtusos, hay de una o cuatro por asca. Fermenta rápidamente la lactosa con formación de gran cantidad de CO₂ y poco de alcohol. Recientemente se han publicado algunos estudios a cerca de la producción de inulinasa por fermentación de *Kluyveromyces marxianus* en extractos de yacón, de espárragos y de tubérculos, con altos rendimientos de actividad enzimática (CASTILLO, y otros, 2010).

l) *Cándida kéfir*

Se encuentra asociado con el suero de mantequilla, el queso y kéfir. Cuando crece en agua de peptona con extracto de levadura glucosa (3 días a 25 C) las células tienen forma ovoide, pueden ser cortas y largas. En cultivos en porta objeto el pseudomicelio es abundante. Fermenta la lactosa y la glucosa, pero se caracteriza por no asimilar la D-xilosa (PORCEL, 2011).

3.2.4.4 Aspectos tecnológicos del kéfir

Al momento de elaborar el kéfir es fundamental tener en cuenta una serie de variables o puntos críticos que pueden modificar las características químicas, microbiológicas, organolépticas, nutricionales y funcionales del producto final, entre las cuales se pueden mencionar algunas.

a) Origen de los granos del kéfir

La composición microbiana de los granos pueden variar dependiendo de su origen geográfico y la manera en como fueron conservados. Est  demostrado, por ejemplo, que la composición de los granos tibetanos de los granos de origen ruso, irlandés y turco, siendo estas diferencias en la comunidad microbiana de los granos la responsable de las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de cada kéfir (RUIZ, y otros, 2017).

b) Tipo de leche

Si bien la leche de vaca es la más común para la elaboración del kéfir, también puede utilizarse otras como la leche de cabra o de oveja y esta puede ser entera o descremada. Debe tenerse en cuenta que cuanto mayor sea la cantidad de grasa de la leche, más cremoso y espeso será el producto. Sin embargo, se ha evidenciado que el uso de leche descremada resulta en un mayor incremento de biomasa de los granos, ya que la mayor cantidad de grasa podría estar inhibiendo o reduciendo el intercambio de nutrientes entre los microorganismos. El kéfir ha sido preparado usando bebida a base de soja, de nuez y de coco, entre otras. Sin embargo, el uso de estos sustratos no lácticos requiere la adición de glucosa, lactosa o sacarosa 1% para estimular el desarrollo de bacterias lácticas y levaduras, y la consecuente producción de ácido láctico y etanol. Además, si bien se logra obtener un producto fermentado, el uso de estas bebidas vegetales debilita notoriamente al gránulo de kéfir, por lo que luego de algunos ciclos de fermentación deben volver a colocarse



en leche para recuperarse, indicando que estas bebidas no lácteas no serían apropiadas para obtención de kéfir (RUIZ, y otros, 2017).

c) Relación gránulo/leche

Los granos de kéfir se inoculan normalmente dentro de 1 al 10% (p/v) dependiendo de las características que se desea obtener. En general, una relación del 1% (p/v) dará lugar a una leche fermentada más viscosa y menos ácida, mientras que una del 10% (p/v) dará por el contrario un producto ácido poco viscoso y más efervescente. Por otro lado, ARÉVALO, y otros (2008) relata a Sasaki quien recomienda una concentración de inóculo de 5% para 24 horas de fermentación, lo cual se consideró para este estudio.

d) Temperatura y tiempo de fermentación

Tradicionalmente el kéfir se prepara a temperatura ambiente, de manera que la fermentación se lleva a cabo entre 18 y 30°C y esto da continuidad a usarse de manera continua el sustrato y 18 a 72 horas de periodo de fermentación. De todas maneras, se considera que la temperatura óptima de elaboración del kéfir es 25°C y si bien la fermentación puede ocurrir a temperaturas elevadas, esto podría aumentar la acidez del producto, así como también afectar la producción de exopolisacárido.

Las condiciones de temperatura y tiempo de fermentación dependen del medio de cultivo en el que se desarrollan los granos de kéfir; como el caso de una mezcla de suero de leche y melaza de caña de azúcar (ARÉVALO, y otros, 2008), de acuerdo al relato los resultados demostraron que los granos de kéfir obtenidos a temperatura variable de fermentación, es decir, a temperatura ambiente entre 19 y 26°C para 24 horas, resultó tener mejor consistencia.

e) Métodos para producir kéfir

Los granos de kéfir crecen durante el proceso de la producción de kéfir, y se reutilizan para las fermentaciones subsecuentes. Para la conservación de los granos, primero se escurre y se deja secar a temperatura ambiente y luego se guardan a temperatura (4°C) (RUIZ, y otros, 2017). En este caso describiremos dos métodos para elaborar el kéfir.

- El proceso tradicional o artesanal consiste en agregar directamente los granos de kéfir (2-10%) en un tarro grande de



crystal y se añade leche que fue pasteurizado y previamente enfriado a temperatura ambiente. Se cierra el tarro de vidrio con un paño de tela en el caso de que el recipiente no esté dotado de tapa hermética. Se dejará la mezcla a temperatura ambiente, ya que en la variación de temperatura se confiere buen desarrollo de la textura y el aroma, debido a que existe una secuencia de actividad de la microbiota de los granos de kéfir. Después de un periodo de fermentación que dura alrededor de 24 horas y en otras ocasiones menores a este tiempo dependiendo la textura que se quiera obtener, los granos son quitados por filtración para repetir otra vez el procedimiento. Tras la fermentación, la leche kefirada de textura suave y sabor algo ácido, ya puede conservarse en el frigorífico durante los días posteriores a su consumo (FERRARI, y otros, 2020).

- Un segundo método, conocido como el “método ruso”, permite la producción del kéfir en una escala más grande, y utiliza una serie de fermentaciones. El primer paso consiste en rejuvenecer los cultivos incubando la leche con los granos (2-3%). Los granos de kéfir entonces son separados por filtración y los cultivos madre que resulta se adicionan a la leche (1-3%) que se fermenta por 12 a 18 horas. Varios problemas asociados al kéfir tradicional han conducido a un método más moderno de producción (RUIZ, y otros, 2017).

El método tradicional produce solamente volúmenes pequeños de kéfir, y requiere varios pasos, cada paso aumenta el riesgo de contaminación. La presión que ejerce el contenido del gas (CO₂), puede conducir a la explosión del recipiente a menos que se utilicen los envases apropiados. Finalmente, la vida de anaquel del kéfir tradicional es muy corto, menos de tres días. Para una conservación más larga, pueden ser liofilizados (liofilizado) o ser congelados (RUIZ, y otros, 2017).

f) **Conservación de los granos de kéfir**

Este producto puede conservarse en leche para que se mantenga fresco, en caso de que no se desee tomar leche kefirada, se puede conservar por varios métodos los granos.



g) Nevera

Dentro del frigorífico lo ideal es conservando en leche fresca a 4°C. Así se mantiene hasta 14 días. Para mayor conservación hay que cambiar la leche cada pocas semanas para alimentar el cultivo. También se puede coconservar en un recipiente con agua no clorada y con azúcar en el refrigerador durante 7-10 días, habiendo enjugado los granos previamente. Los granos así conservados necesitan ser reactivados en el próximo ciclo de fermentación, pues actúan más lentamente por estar inactivos. Para ello conviene dejarlos en leche fresca 2 ó 3 días (RUIZ, y otros, 2017).

h) Congelado

Se limpian bien los granos y se escurre, se introduce en una bolsa de plástico o algún recipiente que pueda contener la cantidad de granos que resulta luego de la fermentación y luego se congela. De esta manera puede conservarse por mucho tiempo. Para descongelarlo, se saca del congelador y se deja en la nevera hasta que se descogele, luego se ponen los granos en leche durante tres días, desechando este primer kéfir. Con la finalidad de reactivar y fortalecer las cepas. En la limpieza no es aconsejable utilizar agua del grifo porque el cloro que contiene puede matar a los microorganismos del kéfir. En el mejor de los casos utilizar agua desmineralizada (FERRARI, y otros, 2020).

i) Deshidratado

Se pone los granos de kéfir sobre el papel de cocina en un sitio aireado, y se remueve cada cierto tiempo hasta que no este pegajoso y tengan un aspecto cristalizado. El tiempo en deshidratarse depende de la ventilación, la temperatura y la humedad ambiental y es de 3-5 días para los granos más grandes.

Una vez deshidratado, los granos de kéfir, puede durar de 2 a 3 meses, siempre y cuando se conserve en un lugar fresco, ya sea un refrigerador, congelador o en seco. Si se quiere hidratar nuevamente se debe introducir en leche por 2 semanas, renovando la leche cada 2 días, es aconsejable no consumir el kéfir resultante, después de este proceso se puede preparar nuevamente kéfir de leche (RUIZ, y otros, 2017).

3.2.4.5 Diferencias entre el kéfir y el yogurt

Esta bebida es muy similar al yogurt, su principal diferencia es el proceso en el que ocurre la fermentación, porque el kéfir se fermenta a través de la reacción lacto-alcohólica (la lactosa de la leche se transforma en ácido láctico y se produce anhídrido carbónico y alcohol; siendo este último de una proporción inferior al 1%); mientras que en el yogurt es solamente láctica (solo se transforma la lactosa en ácido láctico). El mismo se encuentra formado por una leche fermentada con una textura algo espesa, con un sabor más o menos ácido y ligeramente gaseoso (achampañado). La doble fermentación láctica y alcohólica del kéfir, es lo que le hace resultar con características organolépticas que hace diferente del yogurt. Los elementos alimenticios del kéfir no son muy diferentes a los de la leche, de la que se ha elaborado, siendo su calidad biológica superior, ya que sus nutrientes de la leche son más asimilables (RUIZ, y otros, 2017).

El kéfir se produce mediante siembra directa de un cultivo con la siguiente composición:

- *Lactococcus lactis*.
- *Lactococcus cremosis*.
- *L. biovar diacetylactis*.
- *Leuconostoc mesenteroides subs. cremoris*.
- *Lactobacillus plantarum*.
- *Lactobacillus casei*.
- *Kluyveromyces marxianus var. Fragilis (Torula kéfir)*.

Aunque es comparada con el yogurt la microflora del kéfir es mucho más compleja, su estructura es polisacárido y conviven en simbiosis varios organismos.

3.2.4.6 Efectos beneficiosos sobre la salud del kéfir

Se conoce que el kéfir es un probiótico que ejerce efectos beneficiosos para la salud de quienes los consumen, tales como actividad antimicrobiana y antitumoral, inmunomoduladora, antiinflamatoria, cicatrizante, antioxidante, reductora del colesterol y mejora en la tolerancia a la lactosa, el hígado graso y modulación de la microbiota intestinal. Deben tenerse en cuenta que estas propiedades podrían atribuirse tanto a los microorganismos presentes en el

producto como a los metabolitos que ellos producen, y están presentes en la leche fermentada para este caso el kéfir (RUIZ, y otros, 2017).

Dentro de las propiedades probióticas atribuidas a los lactobacilos aislados del kéfir, se puede mencionar la capacidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 de antagonizar el efecto biológico de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) in vitro y los efectos citóxicos de la toxina Shiga tipo II producida por EHEC 0157: H7. Asimismo, se ha descrito su efecto protector sobre la invasión de *Shigella flexneri* a células epiteliales. Por su parte, cepas de *L. kefir* pueden inhibir la adhesión y la invasión de *Salmonella enterica serovar*. Typhimurium a células Caco2/TC-7 (FERRARI, y otros, 2020).

En relación con las levaduras, cepas pertenecientes a especies *S. cerevisiae*, *S. unisporus*, *I. occidentalis* y *K. marxianus* resisten a las condiciones gastrointestinales y adhieren a células Caco-2. Romanin y colaboradores (FERRARI, y otros, 2020) demostraron que levaduras específicas presentes en el kéfir son capaces de modular la respuesta inducida por distintos antagonistas proinflamatorios como flagelina, IL-1 β , TNF- α y LPS. Además, se demostró que el pretratamiento de células epiteliales con *K. marxianus* CIDCA 8154, reduce los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno y en un modelo de *Caenorhabditis elegans* se comprobó que la levadura protege del estrés oxidativo. En el mismo sentido, Cho y colaboradores (FERRARI, y otros, 2020) describieron recientemente que una combinación de *Kluyveromyces* KU140723-02 aislada de kéfir y harina de semilla de uva rica en polifenoles o su extracto tiene actividad antioxidante incrementada. Otros investigadores señalaron que cepas de *S. cerevisiae* aisladas de kéfir brasileño presentaron interesantes propiedades probióticas in vitro. En un ensayo in vivo de colitis inducida químicamente con ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) se demostró que ratones tratados por vía oral con *K. marxianus* CIDCA 8154 presentaron menor daño histopatológico y niveles más bajos de IL-6 circulante. También se ha descrito que la combinación de dos lactocilos, un lactococo y dos levaduras aislados de kéfir protegen células epiteliales cultivadas in vitro de la invasión de *Shigella*, así como también, protegen contra infección por *Clostridium difficile* en un modelo de ratón. Del mismo modo, Londero y colaboradores (FERRARI, y otros, 2020) mostraron las propiedades



antagónicas de un cultivo mixto de cepas de kéfir contra *Salmonella* (FERRARI, y otros, 2020).

3.2.5 Leches fermentadas

De acuerdo a la norma del Codex Alimentarius para leches fermentadas las define como aquellos productos lácteos obtenidos mediante la fermentación de la leche, que pueden haber sido elaborados a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición, atendiendo a algunas limitaciones (sección 3.3 de la norma) por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). Los microorganismos fermentadores son viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente tras la fermentación, no se aplica el requisito de presentar microorganismos viables (SAMPABLO, 2017).

Dentro de este grupo de leches fermentadas podemos encontrar a algunos microorganismos como las bacterias lácticas y levaduras que en conjunto siguen una doble ruta en la fermentación láctica. Denominada como fermentación heteroláctica de la leche por acción de bacterias (fermentación láctica) y levaduras (fermentación alcohólica). En este grupo podemos nombrar al kéfir. Son bebidas ligeramente alcohólicas (hasta un 2% de etanol), espumosas, debido al CO₂ producido y ácidas como consecuencia del ácido láctico generado (SAMPABLO, 2017). En la Tabla 7 se muestra los requisitos de acuerdo a la norma internacional Codex STAN 243. 2003, para leches fermentadas tipo kéfir.

Tabla 7 – Requisitos químicos de la norma internacional Codex STAN 243. 2003, norma del Codex para leches fermentadas.

Descripción químico	Leche fermentada con granos de kéfir
Proteína láctea ^(a y b) (% w/w)	min. 2,7%
Grasa láctea (% w/w)	<10%
Acidez valorable, expresada como % de ácido láctico (% w/w)	min. 0,6%
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido ^(c) (ufc/g, en total)	min. 10 ⁷
Levaduras (ufc/g)	min. 10 ⁴

(a) El contenido en proteínas es 6,38 multiplicado por el nitrógeno Kjeldahl total determinado.

- (b) Se aplica cuando en el etiquetado se realiza una declaración de contenido que se refiere a la presencia de un microorganismo específico que ha sido agregado como complemento del cultivo específico.
- (c) Cultivo preparado a partir de gránulos de kéfir, *Lactobacillus kefir*, especies del género *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter* que crecen en una estrecha relación específica. Los granos de kéfir constituyen tanto levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) como levaduras fermentadoras sin lactosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*).

3.3 Marco conceptual

- a) **Bacterias ácido lácticas (BAL):** en este grupo se incluye una clasificación funcional de bacterias no patógenas, no toxigénicas Gram positivas, fermentativas, que se asocian a la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles para fermentación de alimentos. En este grupo se incluyen las especies de *Lactobacillus*, *lactococcus* y *streptococcus thermophilus*. Donde que el género *bifidobacterium* no se asocia con fermentación de alimentos y es taxonómicamente diferente de otras BAL. Muchos probióticos también son BAL (GARCIA , y otros, 2015).
- b) **Nódulos de kéfir:** El nódulo de kéfir también se parece a pequeños ramilletes de coliflor o, incluso, a un coral o a una esponja de mar. Pero tal vez sea su textura, más que su forma, lo que resulta más característico (GARCIA , y otros, 2015).
- c) **Prebiótico:** Es un ingrediente alimenticio no digerible que estimula selectivamente el crecimiento y actividad de un grupo limitado de bacterias en el colon. Los ingredientes utilizados como prebióticos son los galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) (OLIVEIRA, y otros, 2016).
- d) **Probiótico:** El probiótico se define como un ingrediente microbiano vivo que, al ser ingerido en cantidades suficientes, influye positivamente en la salud de quien consume. Las bacterias probióticas comunes, que están mayoritariamente en el tracto intestinal, pertenecen a los géneros *bifidobacterium* y *lactobacillus*. Estas bacterias producen compuestos como ácidos orgánicos y bacteriocinas de microorganismos patógenos (OLIVEIRA, y otros, 2016).
- e) **Simbiótico:** Los simbióticos son combinaciones apropiadas de prebióticos y probióticos. Un producto simbiótico ejerce tanto un efecto prebiótico como probiótico (VEGAS, y otros, 2013).



CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA

4.1 Tipo y nivel de investigación

El tipo de diseño de investigación fue experimental, el investigador manipulo deliberadamente una o más variables independientes (concentración de jarabe de yacón y tiempo de fermentación) para analizar los efectos de esa manipulación sobre una o más variables dependientes (atributos dulzor, pH, rendimiento de biomasa, acidez, composición proximal y caracterización microbiológica). Por cuanto se pretendió incrementar el conocimiento de la línea de investigación de fermentaciones lácticas tipo kéfir. Elaborando una bebida funcional con gránulos de kéfir, actuando como agente biológico (probiótico) y el jarabe de yacón como prebiótico.

En la presente investigación se utilizó el método experimental, recolectándose los resultados de las pruebas experimentales en laboratorio, mediante la observación directa y con la ayuda de equipos e instrumentos de medición. La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Química de Alimentos y Laboratorio de Procesamiento Productos Agroindustriales de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMBA.

4.2 Diseño de la investigación

El análisis estadístico que se realizó fue un diseño factorial 3×3, que consistió en 9 tratamientos o puntos experimentales, cada tratamiento se realizó por triplicado con un total de 27 observaciones, cuyos resultados fueron evaluados estadísticamente a fin de determinar las diferencias significativas entre ellos.

4.3 Descripción estadística de la investigación

El análisis factorial A*B se describe mediante el comportamiento de las respuestas Y_{ijk} .

$$y_{ijk} = \mu + A_j + B_k + (A \times B)_{jk} + E_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} : Observación individual

μ : Media general

A_j : Efecto del nivel j – énsimo del factor A.

B_k : Efecto de nivel k – énsimo del factor B.

$(A \times B)_{jk}$: Efectos de interacciones dobles (de dos factores) en el nivel jk del factor A y B.



E_{ijk} : Error aleatorio en la combinación ijk .

i : Repeticiones o réplicas del experimento.

Todos los efectos cumplen restricción de sumar cero, es decir, son observaciones respecto a la media general μ .

A_j : Concentración de jarabe de yacón (3 niveles; $j = 1, 2, 3$); $A_1 = 10\%$; $A_2 = 12\%$ y $A_3 = 15\%$

B_k : Tiempo de fermentación (3 niveles; $k = 1, 2, 3$); $B_1 = 12h$; $B_2 = 18h$ y $B_3 = 24h$

Tabla 8 – Diseño factorial para formulación de una bebida simbiótica funcional

Concentración de Jarabe de Yacón	Tiempo de Fermentación (B_k)			Total de Tratamientos
	$B_1 = 12h$	$B_2 = 18h$	$B_3 = 24h$	
(A_j)	$B_1 = 12h$	$B_2 = 18h$	$B_3 = 24h$	$T = 9$
$A_1 = 10\%$	T_1	T_2	T_3	3
$A_2 = 12\%$	T_4	T_5	T_6	3
$A_3 = 15\%$	T_7	T_8	T_9	3

Tabla 9 – ANOVA para análisis de datos de biomasa y pH de la bebida simbiótica funcional

Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico para F
A		$a - 1$				
B		$b - 1$				
AB		$(a - 1)(b - 1)$				
Error		$ab(n - 1)$				
		$abn - 1$				
Total		$a - 1$				

4.4 Población y muestra

La investigación se realizó en los laboratorios de Química de Alimentos y Procesamiento de Productos Agroindustriales de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, durante los meses de julio a agosto del 2017.

La técnica de muestreo que se siguió en la presente investigación fue de tipo no probabilístico, dirigida y definida a criterio del investigador.



Para elegir el tamaño de la muestra se utilizó el muestreo no probabilístico por conveniencia. Es decir, la cantidad de muestra a utilizar para la investigación fue definida por el requerimiento necesario del número de ensayos a realizar, la cantidad de leche que se utilizó fue 7L y 500mL, 5 kilos de raíces de yacón.

4.5 Procedimiento de la investigación

4.5.1 Medio de cultivo patrón

Como medio cultivo patrón se utilizó leche fresca pasteurizada y desnatada proveniente de la empresa “Tambo grande”, en buenas condiciones de salubridad.

4.5.2 Probiótico

Los granos de kéfir fueron recolectados de mercados diferentes, “San Pedro” y “Wanchaq” de la ciudad de Cusco, enseguida inoculados en leche pasteurizada a fin de rejuvenecer, fortalecer y cruzar las cepas de la microbiota de los granos de kéfir, de manera que se obtuvo una sola fuente de inóculo para los tratamientos posteriores. En la Figura 3 se observa los granos de kéfir recolectados y rejuvenecidos, este último sirvió como fuente de inóculo.



Figura 3 – Granos de kéfir recolectados (a) y granos de kéfir rejuvenecidos (b)

4.5.3 Prebiótico

Como ingrediente prebiótico se utilizó jarabe de yacón, obtenido en Laboratorio de Procesamiento de Productos Agroindustriales de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial (UNAMBA), proceso que se describe en el acápite 4.5.4 y en la Figura 4 se observa el jarabe de yacón obtenido a 66° Brix.



Figura 4 – Jarabe de yacón con 66°Brix de concentración de azúcares.

4.5.4 Obtención de jarabe de yacón

Las raíces frescas de yacón utilizados en el proceso de obtención jarabe de yacón, fueron obtenidas del Mercado de abastos de las Américas de la ciudad de Abancay. Para la elaboración del jarabe de yacón se tuvo en cuenta la metodología sugerida por PARRA (2013) con algunas modificaciones, se seleccionó el yacón, teniendo en cuenta que no presentara signos de pudrición y/o contaminación microbiana; se lavó con abundante agua potable eliminándose restos de tierra y materia orgánica adheridos.

Seguidamente, fue sumergido en una solución de 200 ppm de hipoclorito de sodio por 5 minutos para reducir la carga microbiana, procediéndose al retiro de la cascará del yacón.

Posteriormente, el jugo fue extraído con una licuadora y para controlar el pardeamiento se usó jugo de limón; y se realizó la filtración del jugo con la ayuda de una tela fina, con el objetivo de disminuir la carga de partículas insolubles; se concentró el jugo hasta alcanzar 66°Brix en una olla. El concentrado se dejó enfriar y se almacenó en condiciones de refrigeración hasta su utilización en los ensayos de fermentación.

4.5.5 Ensayos de fermentación

4.5.1.1. Determinación simultánea del tiempo de fermentación y concentración de jarabe de yacón

Se utilizó nueve frascos de 500mL de capacidad con 200mL de medio de cultivo, es decir, leche previamente pasteurizada y desnatada, dividiéndose en grupos de tres para las concentraciones 10, 12 y 15% de jarabe de yacón, previamente definidas a través de corridas preliminares y PARRA (2016). Seguidamente, fue adicionado 5% del ingrediente probiótico granos de kéfir



a cada tratamiento, tal como lo recomienda ARÉVALO, y otros (2008), luego cada concentración fue llevada a tiempos de fermentación 12, 18 y 24 horas, en una estufa Memmert, con temperatura constante 26 °C, de acuerdo al procedimiento seguido por RAMIREZ, y otros (2016), y posteriormente se identificó el tratamiento de fermentación más adecuado, considerando el pH, rendimiento de biomasa húmeda y formación de fases, estos fueron los factores considerados en la identificación de productos idóneos de fermentación (GARCIA , y otros, 2015).

4.5.1.2.Determinación del rendimiento biomasa húmeda, al término de cada tiempo de fermentación

Para cada tratamiento los granos de kéfir fueron separados de la bebida simbiótica, filtrándose en un tamiz plástico, y luego lavados con agua desmineralizada estéril. Posteriormente, la biomasa (granos de Kéfir) fue pesada en una balanza analítica, registrándose el peso para el cálculo del rendimiento por tratamiento, y la bebida simbiótica funcional fue almacenada en refrigeración hasta antes de iniciar su evaluación.

4.5.1.3.Medición de pH

Con la bebida simbiótica funcional previamente almacenada y filtrada, en cada tiempo de fermentación se midió pH con la ayuda de un potenciómetro previamente calibrado.

Se agitó con una bagueta la bebida simbiótica funcional filtrada que fue obtenida en cada proceso y se sumergió el electrodo directamente en las muestras en cada uno de los tratamientos, registrándose los datos para su evaluación estadística.

4.5.1.4.Prueba de aceptabilidad de la bebida simbiótica funcional con adición de granos de kéfir y jarabe de yacón.

Se utilizó la metodología propuesta por PRETELL, y otros (2012) utilizando una escala hedónica de nueve categorías: 1: me disgusta muchísimo, 2: me disgusta mucho, 3: me disgusta moderadamente, 4: me disgusta poco, 5: no me gusta, 6: me gusta poco, 7: me gusta moderadamente, 8: me gusta mucho y 9: me gusta muchísimo.

Esta prueba fue realizada por un panel de degustación conformado por 40 personas de ambos sexos, todos ellos de la Escuela Académica Profesional

de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

La evaluación sensorial se realizó al tratamiento donde no se observó formación de fases, que correspondió al tiempo de fermentación de 12 horas. En el Anexo 3 se muestra la ficha de escala hedónica para aceptabilidad del dulzor en la bebida simbiótica funcional.

4.5.1.5. Análisis fisicoquímico y microbiológico de la bebida simbiótica funcional con adición de granos de kéfir y jarabe de yacón

Los análisis fisicoquímico y microbiológico fueron realizados a la bebida simbiótica funcional idónea obtenida en las condiciones adecuadas de fermentación y mejor aceptabilidad de dulzor al término del tiempo de fermentación. Posteriormente, todas estas muestras aceptables fueron enviadas en condiciones de refrigeración, al laboratorio externo, La Molina Calidad Total Laboratorios-UNALM, para su respectiva evaluación. Luego los resultados se compararon con los parámetros establecidos por la Norma del Codex para leches fermentadas tipo kéfir Codex *STAN* 243–2003. En el siguiente se menciona la determinación de los parámetros fisicoquímicos.

a) *Medición de la acidez titulable*

Se determinó el porcentaje de la acidez total por la metodología sugerida por NTP 2002. 150 1998.

- Esta prueba fue determinada en el producto final con mejores condiciones de fermentación y aceptabilidad.
- Se pesó 10g de muestra (leche fermentada) en un vaso precipitado de 50mL y fue diluido al doble del volumen, usando agua desmineralizada libre de CO₂.
- Se añadió 3 gotas de fenolftaleína, se agitó y valoró con solución de NaOH 0,1N hasta que el primer color rosa fuera persistente.
- Luego se calculó el porcentaje de la acidez total expresado en términos de ácido láctico por la siguiente ecuación y tener en cuenta que cada décima de centímetro cúbico de gasto de solución de NaOH 0,1 Normal, equivale a 0,01 de ácido láctico o 1°D (Dornic).

$$\% \text{ acidez total} = \frac{\text{ml NaOH} \times N \times 0.09}{\text{g de muestra}} \times 100$$

Donde:



N = Normalidad de hidróxido de sodio.

0,09 = Miliequivalentes del ácido láctico

b) *Determinación de proteínas*

Se determinó el porcentaje de proteína total por el método Kjeldhal de la AOAC official Method 991. 20.

Preparación de la muestra

- Se colocaron 15g de K_2SO_4 1mL de una solución de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,05g/mL) y entre 8 a 10 perlas de ebullición en un balón Kjeldhal.
- Se llevó la muestra a $39 \pm 1^\circ C$ en baño maría, se homogenizaron vigorosamente con un agitador de vidrio, se dejó enfriar y se pesó 5,0g e inmediatamente se colocaron en el balón Kjeldhal.
- Se agregó 25mL de H_2SO_4 concentrado, por las paredes del balón Kjeldahl.

Ajuste del calentador del digestor

- Se precalentó el digestor durante 30 minutos.
- Se añadió al balón Kjeldhal que contenía la muestra y el H_2SO_4 concentrado, 250mL de agua desmineralizada a $25^\circ C$ y entre 3 a 4 perlas de ebullición y se colocó el balón en el digestor precalentado.
- La temperatura máxima del digestor se logró en aproximadamente 5 a 6 minutos.

Digestión

- Se calentó la muestra aceptable del kéfir durante 1,5 horas a la temperatura máxima del digestor hasta que presente una coloración clara, luego se enfrió a una temperatura ambiente.
- Se añadió 300mL de agua destilada al balón, se agitó y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente antes de la destilación.

Destilación

- Se encendió el condensador.
- Se añadió 50mL de solución al 4% de ácido bórico y 1–2 gotas de indicador rojo de metilo–verde de bromacresol a un Erlenmeyer de 500 mL y se colocó en el condensador con el extremo de este sumergido en el ácido bórico.



- Se añadió con cuidado 75mL de solución de NaOH al 50% por la pared del balón Kjeldahl sin agitarlo.
- Se agitó el balón vigorosamente para mezclar el contenido del fondo y se calentaron hasta que todo el NH₃ se haya destilado (≥150 mL de destilado de volumen total).
- Se recibió el destilado en el Erlenmeyer y se dejó drenar el líquido del extremo del condensador, el cual se lavó con agua destilada (aprox. 10 mL).
- Se apagó el calentador de destilación y luego se retiró el destilado.

Titulación

- Se tituló el destilado directamente con solución de ácido clorhídrico 0,1 N, hasta el punto final (color rosado).
- Se realizó la determinación por duplicado y se llevaron un blanco de reactivos y posteriormente se calcularon el % de nitrógeno con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{0.014007 \times (V_s - V_b) \times N}{P} \times 100$$

Donde:

$V_s - V_b$ = mL de solución de HCl 0,1 N usado para valorar la muestra y el blanco respectivamente.

N = Normalidad de la solución de HCl.

P = Peso de la porción de muestra en g

0.014007 = Miliequivalentes de nitrógeno.

Multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor 6.38 se obtendrá el porcentaje de proteínas presentes en la muestra.

c) Determinación de grasa

Se determinó el porcentaje de grasa por el Método Roese – Gottlieb de la AOAC Official Method 905.02 modificado, se preparó la muestra de la bebida simbiótica funcional según procedimiento de la AOAC Official Method 925. 21.

- La muestra se llevó a una temperatura de aproximadamente 20°C y se homogenizó con agitación vigorosa.
- Luego se pesó aproximadamente 10,0g y se transfirió a un tubo de ensayo con capacidad de 100mL.



- Se añadió 2mL de NH_4OH y 10mL de alcohol bien mezclado después de cada adición.
- Se añadió 25mL de éter dietílico libre de peróxidos y se tapó el tubo con un tapón de caucho sintético (que no es afectado por grasa ni por solventes), y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Se dejó enfriar durante 15 minutos.
- Luego se añadió 25mL de éter de petróleo ligero (p.e. 40 – 60°C) y se agitó vigorosamente durante 30 segundos.
- Se centrifugó el tubo aproximadamente a 600 rpm durante 5 minutos.
- Se decantó la solución etérea en una cápsula de metal.
- Se lavaron las paredes del tubo de extracción, con una mezcla de partes iguales de los dos éteres usados anteriormente y se agregaron los lavados a la cápsula de metal.
- Se repitió dos veces la extracción al líquido remanente que estaba en el tubo, usando 15mL de cada solvente.
- Se evaporó los disolventes por completo en baño de vapor a una temperatura que no produzca salpicaduras (se añadirán perlas de ebullición).
- Se colocó en la estufa la cápsula de metal a 102 ± 2 °C para secar la grasa hasta peso constante y se dejó enfriar en un desecador 5 minutos aproximadamente y se pesó en balanza analítica.
- Se removió la grasa completamente de la cápsula con 15 a 25mL de éter de petróleo caliente, se volvió a secar y a pesar.
- La pérdida de peso equivalió al peso de la grasa de la muestra.

Se determinó el porcentaje de grasa con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ grasas} = \frac{M - m}{P} \times 100$$

M = Peso del crisol y de las cenizas después de la incineración y enfriamiento posterior en gramos.

m = Peso del crisol vacío en gramos.

P = Peso en gramos de la muestra empleada en la determinación de las cenizas.

d) Análisis microbiológico



Se determinó las características microbiológicas según la metodología sugerida por Rosa y Romero (2012) al tratamiento que tuvo mayor aceptabilidad.

Preparación de la muestra

- Se preparó la dilución 10^{-1} , pesando 10g de muestra de una forma aséptica en un frasco que contiene 90mL de solución de buffer fosfato pH 7,2.
- Se transfirió el contenido del frasco a una bolsa de plástico estéril y se colocó en el Stomacher, agitándose por 30 segundos a 200rpm.
- Se procedió a preparar la dilución 10^{-2} , agitando el frasco que contenía la dilución 10^{-1} , y de la cual se tomó 10mL con una pipeta estéril. Estos 10mL se adicionaron al segundo frasco de dilución que contenía 90ml de solución de buffer fosfato pH 7,2.
- Se agitó la dilución para homogenizarla y a continuación se procedió a preparar la dilución 10^{-3} , tomando 10mL de la solución 10^{-2} , con la pipeta estéril. Estos 10mL se adicionaron a un tercer frasco de dilución que contenía 90mL de solución de buffer fosfato pH 7,2. Se agitó la dilución para lograr homogenizarla.

e) Recuento de bacterias lácticas

El recuento de hongos y levaduras se realiza según el método de recuento en placa vertida propuesto por el Bacteriological Analytical Manual (BAM).

- Se pipeteo 1mL de la solución 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , por duplicado y se colocó en placas de Petri estériles debidamente rotuladas.
- Se adicionó a cada una de las placas 20mL de agar para dextrosa acidificado con ácido tartárico (pH 3,5), luego fue llevado a una temperatura de 45°C, se mezcló y se dejó solidificar el agar y luego se sellaron con tirro.
- Se vertió las placas y se incubó a una temperatura de ambiente durante 5 a 7 días. Luego se llevó a un control de medio.
- Se observó el crecimiento de levaduras, y se contaron con la ayuda de una cuenta colonias.



CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Análisis de resultados

5.1.1. Determinación simultánea del tiempo de fermentación y concentración de jarabe de yacón en la formulación de la bebida simbiótica funcional.

Al finalizar el periodo de fermentación para cada tratamiento se observó que el tratamiento con 12 h de fermentación, concentraciones 10, 12 y 15% de jarabe de yacón, no presentó separación de fases en relación a los tratamientos con 18 y 24 horas de fermentación, tal como se observa en la Figura 5.

En todos los tratamientos fue observado formación de sedimento, partículas insolubles de jarabe de yacón, y cambio en la tonalidad del color en la mezcla simbiótica o bebida láctea fermentada tipo kéfir.

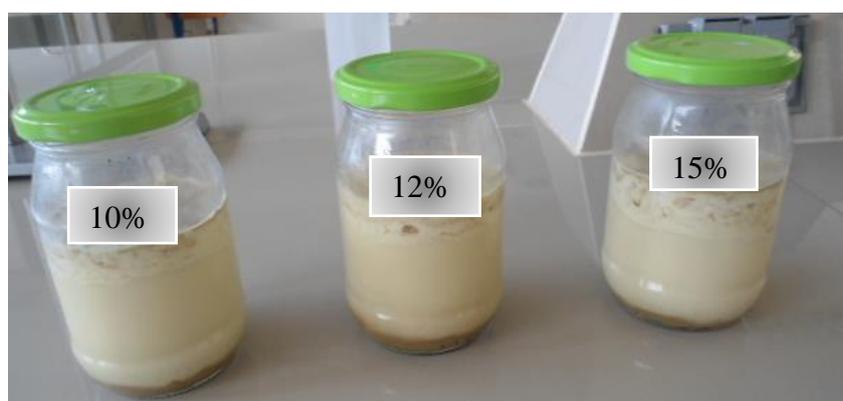


Figura 5 — Bebida simbiótica funcional con 12 horas de fermentación y concentraciones de jarabe de yacón 10, 12 y 15%.

5.1.2. Determinación de rendimiento de biomasa húmeda en la bebida simbiótica funcional formulada

En la Tabla 10 se observa el rendimiento de biomasa húmeda en función al tiempo de fermentación (B_k) y concentración de jarabe de yacón (A_j), cada uno en tres niveles totalizando 27 tratamientos.

Tabla 10 — Rendimiento de biomasa húmeda (g) en función a la concentración de jarabe de yacón y tiempo de fermentación.

Biomasa	Concentración de jarabe de yacón	Tiempo de fermentación		
		12 horas	18 horas	24 horas
Incremento peso húmedo (g)	10%	1,47±0,46	1,63±0,25	2,60±0,35
	12%	1,73±0,12	1,94±0,28	2,38±0,20
	15%	1,91±0,41	2,59±0,21	2,62±0,15

- **Análisis estadístico de los resultados de rendimiento biomasa húmeda.**

El modelo estadístico utilizado para el diseño fue 3^k . Es decir 3^2 , donde 3 representa el número de repeticiones y 2 el número de factores. A continuación, se expresa considerando el efecto individual de cada factor y la interacción entre ambos:

$$y_{ijk} = \mu + A_j + B_k + (A \times B)_{jk} + E_{ijk}$$

Donde A_j , es el efecto del factor A en su nivel i , B_k representa el efecto del factor B en su nivel k , $(A \times B)_{jk}$ es el efecto de interacción de ambos niveles ij y n es el número de repeticiones de cada tratamiento (GUTIERREZ, y otros, 2010).

En el análisis de varianza, se realizó varios pasos, siendo el primer de ellos el planteamiento de hipótesis, con la finalidad de poder aceptar o rechazar lo planteado, utilizando la prueba F como herramienta estadística de contraste.

Planteamiento de hipótesis

La hipótesis que se desea probar es:

- Efecto del factor concentración jarabe de yacón (A_j) en sus tres niveles sobre el rendimiento de biomasa húmeda (y_{ijk}) en la bebida simbiótica funcional.

$H_0: A_j = 0$ (no hay efecto significativo del factor A sobre la variable respuesta), es decir, los rendimientos de biomasa húmeda en la bebida simbiótica funcional son similares.

- Efecto del factor tiempo de fermentación (B_k) sobre el rendimiento de biomasa húmeda (y_{ijk}) en la bebida simbiótica funcional.

$H_0: B_k = 0$ (no hay efecto significativo del factor B sobre la variable respuesta) es decir, los rendimientos de biomasa húmeda en la bebida simbiótica funcional son similares.



- Efecto de la interacción entre concentración de jarabe de yacón (A_j) y tiempo de fermentación (B_k) sobre el rendimiento de biomasa húmeda (y_{ikj}) en la bebida simbiótica funcional.

$H_0: (A \times B)_{jk} = 0$ (no hay efecto significativo de interacción de los factores A y B sobre la variable de respuesta), es decir, la interacción concentración de jarabe de yacón y tiempo de fermentación no influye sobre el rendimiento de biomasa húmeda (y_{ikj}) en la bebida simbiótica funcional.

Criterios del contraste

Se utilizó como criterio de contraste el nivel de significancia: $\alpha = 0,05$. En la Tabla 11, se detalla la determinación de análisis de varianza para un diseño de 3^2 en relación al rendimiento de biomasa húmeda en la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón, observándose diferencias significativas para la fuente de variación tiempo de fermentación (B_k), es decir, que los rendimientos de biomasa húmeda en la bebida simbiótica funcional, fueron diferentes. Al menos uno de los tiempos de fermentación influye en el rendimiento de biomasa húmeda. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna ($B_k \neq 0$).

Tabla 11 — Análisis de varianza (ANOVA) de dos factores de rendimiento biomasa húmeda

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	1,1052	2	0,5526	1,6134	0,2267	3,5546 > 1,6134
B	3,1091	2	1,5545	4,5386	0,0254	3,5546 < 4,5386*
AB	0,7656	4	0,1914	0,5588	0,6954	2,9277 > 0,5588
Error	6,1653	18	0,3425			
Total	11,1451	26				

Al realizar el ANOVA para rendimiento de biomasa, la estadística muestra diferencia significativa de sus medias en el tiempo de fermentación, p -valor < 0,05, entonces se rechaza la H_0 , y se acepta la $H_a: \mu_i \neq \mu_k$, existe diferencia significativa en el rendimiento de biomasa húmeda en la bebida simbiótica funcional, por ello se realizó la comparación de Medias de Tukey.

$$q_{0.05} = \sqrt[3,18]{\frac{MS_e}{n}}$$



$$q_{0.05} = 1.220$$

- a. Los promedios de rendimiento biomasa húmeda a 24h de fermentación.

	Y1	Y2	Y3
Y1		0.22	0.01
Y2			0.23
Y3			

- b. Los promedios de rendimiento biomasa húmeda a 18h de fermentación.

	Y1	Y2	Y3
Y1		0.31	0.96
Y2			0.65
Y3			

- c. Los promedios de rendimiento biomasa húmeda a 12h de fermentación

	Y1	Y2	Y3
Y1		0.27	0.45
Y2			0.18
Y3			

De acuerdo con la Figura 6 se observó que el mayor rendimiento de biomasa húmeda se dio en la concentración 15% de jarabe de yacón, y a esta misma concentración luego de 24 h de fermentación, el rendimiento de biomasa húmeda fue el más alto.



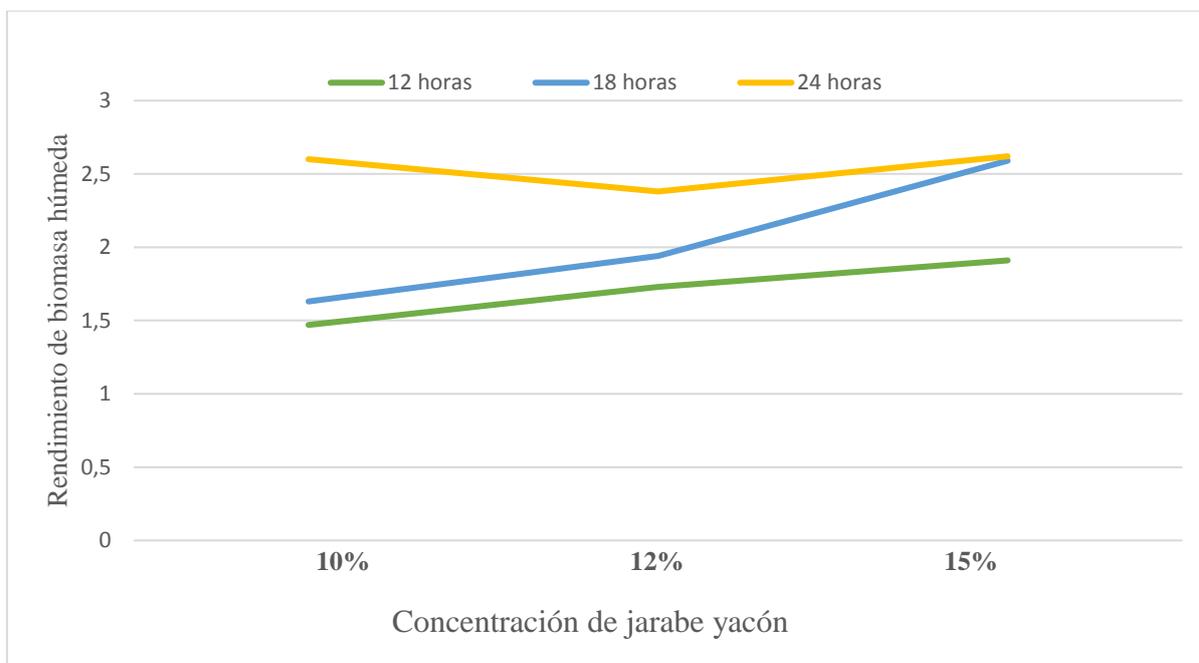


Figura 6 – Rendimiento de biomasa húmeda (g) en función a la concentración de jarabe de yacón y tiempo de fermentación.

5.1.3. Medición de pH en la fermentación de la bebida simbiótica funcional.

En la Tabla 12 se observa los resultados obtenidos, medición de pH promedio de la bebida simbiótica funcional, previamente agitada y filtrada al finalizar cada tiempo de fermentación, esta medición se realizó en cada uno de los tratamientos propuestos.

Tabla 12 – Resultados de promedio de pH fermentación en la bebida simbiótica funcional formulada

Concentración de jarabe de yacón	Tiempo de fermentación		
	12 horas	18 horas	24 horas
10%	4,75±0,015	4,18±0,004	4,27±0,005
12%	4,81±0,010	4,27±0,004	4,29±0,016
15%	4,70±0,002	4,30±0,013	4,25±0,005

Planteamiento de hipótesis

La hipótesis que se desea probar es:

- Efecto de la concentración de jarabe de yacón (A_j) en sus tres niveles sobre el pH de fermentación (y_{ikj}) en la bebida simbiótica funcional.

$H_0: A_j = 0$ (no hay efecto significativo del factor A sobre la variable respuesta), es decir, el pH de fermentación en la bebida simbiótica funcional son similares.



- Efecto del factor tiempo de fermentación (B_k) sobre el pH de fermentación (y_{ikj}) en la bebida simbiótica funcional.

$H_0: B_k = 0$ (no hay efecto significativo del factor B sobre la variable respuesta) es decir, el pH de fermentación en la bebida simbiótica funcional, son similares.

- Efecto de la interacción entre concentración de jarabe de yacón (A_j) y tiempo de fermentación (B_k) sobre el pH de fermentación (y_{ikj}) en la bebida simbiótica funcional.

$H_0: (A \times B)_{jk} = 0$ (no hay efecto significativo de interacción de los factores A y B sobre la variable de respuesta), es decir la interacción concentración de jarabe de yacón y tiempo de fermentación no influye sobre el pH de fermentación (y_{ikj}) en la bebida simbiótica funcional.

Criterios del contraste

Se utilizó como criterio de contraste el nivel de significancia: $\alpha = 0,05$. En la Tabla 13, se detalla la determinación de análisis de varianza para un diseño de 3^2 en relación al pH de fermentación en la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón. Observándose diferencias significativas para la fuente de variación tiempo de fermentación (B_k), es decir que los rendimientos de biomasa húmeda en la bebida simbiótica funcional, fueron diferentes. Al menos uno de los tiempos de fermentación influye en el rendimiento de biomasa húmeda. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna ($B_k \neq 0$). De la misma forma existen diferencias significativas en la interacción del tiempo de fermentación (B_k) y concentración de jarabe de yacón (A_j). Al menos uno de estos factores influye en el pH de fermentación de la bebida simbiótica funcional. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna ($B_k \neq 0$).

Tabla 13 – Análisis de varianza (ANOVA) de dos factores de medición de pH.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
A	0,0077	2	0,0038	1,7965	0,1944	3,5546 > 1,7965
B	1,4380	2	0,7190	337,6191	5,36E-15	3,5546 < 337,6191*
AB	0,0463	4	0,0116	5,4330	0,0048	2,9277 < 5,4330*
Error	0,0383	18	0,0021			
Total	1.5303	26				



Al realizar el ANOVA para la medición del pH de la bebida simbiótica funcional, la estadística muestra diferencias significativas de sus medias en el tiempo de fermentación, y la interacción del tiempo de fermentación y jarabe de yacón, ya que p-valor < 0,05, entonces se rechaza la H_0 , y se acepta la $H_a: \mu_i \neq \mu_k$, existe diferencia significativa en el rendimiento de biomasa húmeda en la bebida simbiótica funcional, por ello se realizó la comparación de Medias de Tukey.

$$q_{0.05} = \sqrt[3,18]{\frac{MS_e}{n}}$$

$$q_{0.05} = 0.093$$

- a. Los promedios de rendimiento biomasa húmeda a 24h de fermentación.

	Y1	Y2	Y3
Y1		-0.003	0.03
Y2			0.03
Y3			

- b. Los promedios de rendimiento biomasa húmeda a 18h de fermentación.

	Y1	Y2	Y3
Y1		0.09	0.16
Y2			0.07
Y3			

- c. Los promedios de rendimiento biomasa húmeda a 12h de fermentación

	Y1	Y2	Y3
Y1		0.03	-0.06
Y2			-0.09
Y3			

De acuerdo con la Figura 7 se observó a un tiempo de fermentación 12 h, mayor valor de pH en las tres concentraciones de jarabe de yacón de la bebida simbiótica funcional, sin embargo, luego de 24 h de fermentación, el rendimiento de biomasa húmeda fue el más alto a la concentración 15% de jarabe de yacón.

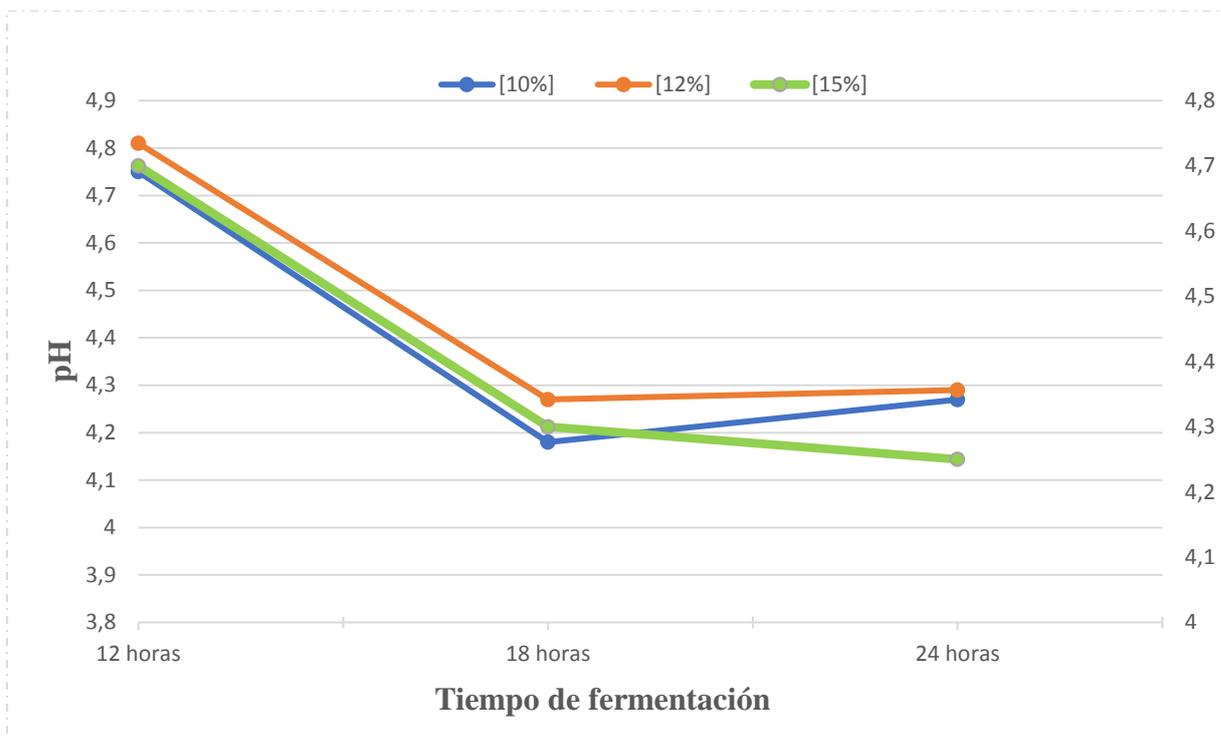


Figura 7 — Comportamiento de pH bebida simbiótica funcional en función de concentración de jarabe de yacón y tiempo de fermentación.

5.1.4. Prueba de aceptabilidad en la formulación de la bebida simbiótica funcional

El análisis estadístico de los resultados obtenidos del panel de evaluación sensorial se procesó mediante el modelo Kruskal Wallis, por tratarse de variables discretas y no poseer distribución normal.

En la Tabla 14 se observa los resultados de preferencia de los panelistas de degustación respecto a la aceptabilidad del dulzor de los tratamientos que resultaron con consistencia parecida a la bebida fermentada tipo kéfir. Asimismo, no presentaron separación de fases, el tratamiento con 12h de fermentación y a tres concentraciones de jarabe de yacón (10, 12 y 15%). Cada formulación fue degustada por 40 panelistas que fueron estudiantes de la Escuela Académica Profesional Ingeniería Agroindustrial de la UNAMBA, a quienes se les pidió que dieran su opinión sobre el grado dulzor de la mezcla simbiótica. Los valores expresados en el Anexo 3 indican las escalas entre me gusta muchísimo y me disgusta muchísimo (traducida en escala numérica de 1 a 9).

Tabla 14 — Preferencias de los panelistas de degustación del dulzor de la bebida simbiótica a diferentes concentraciones de jarabe de yacón y tiempo de fermentación 12 h.



Panelista	Dulzor		
	[]10%	[]12%	[]15%
1	2	8	8
2	3	7	9
3	4	7	7
4	4	7	9
5	4	7	8
6	5	5	8
7	6	4	8
8	4	9	8
9	3	9	5
10	2	6	5
11	2	6	7
12	2	6	8
13	5	6	9
14	7	5	8
15	6	7	8
16	5	7	9
17	4	8	8
18	4	5	9
19	3	6	8
20	8	8	8
21	3	5	8
22	2	5	8
23	2	6	8
24	4	6	9
25	4	7	9
26	4	8	7
27	4	5	5
28	3	6	4
29	5	4	3
30	6	5	8
31	7	6	8
32	4	7	7
33	5	5	9
34	6	6	8
35	4	7	7
36	3	6	9
37	3	5	8
38	4	5	8
39	2	5	9
40	6	4	8

Tabla 15 – Estadísticos de degustación para concentraciones de jarabe de yacón y 12h de fermentación

		DEGUSTACIÓN 10%	DEGUSTACIÓN 12%	DEGUSTACIÓN 15%
N	Válidos	40	40	40
	Perdidos	80	80	80
Media		4,10	6,15	7,68
Mediana		4,00	6,00	8,00
Desv. típ.		1,549	1,292	1,421
Varianza		2,400	1,669	2,020
Mínimo		2	4	3
Máximo		8	9	9

A continuación, se determinó las diferencias significativas entre los grupos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis conocida como la Prueba H. Se observa en la Tabla 16 los resultados de la aplicación de dicha prueba.

Tabla 16 – Estadísticos de contraste de prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluación del dulzor de la bebida simbiótica funcional^{a,b}

	CONCENTRACIÓN DE JARABE YACÓN
Chi-cuadrado	57,147
GL	2
Sig. asintót.	,000
a. Prueba de Kruskal-Wallis	
b. Variable de agrupación: Dulzor	

Planteamiento de hipótesis

La hipótesis que se desea probar es:

H₀: No hay diferencias significativas entre los grupos en la degustación de la bebida simbiótica funcional.

H_a: Hay diferencias significativas entre los grupos en la degustación de la bebida simbiótica funcional.

En la Tabla 16 luego de ser comparados el valor F_C se observó que existen diferencias significativas entre los grupos de degustación. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

5.1.5. Análisis fisicoquímico y microbiológico de la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón.

Los ensayos fisicoquímicos y microbiológicos se determinaron en función de las especificaciones establecidas por la Norma Internacional Codex *STAN 243 – 2003* Norma del Codex para leches fermentadas tipo kéfir.

A continuación, en la Tabla 17 se observa los resultados de los ensayos fisicoquímicos realizados en 100 g de la muestra aceptable, es decir, para el tratamiento 12 horas de fermentación y 15% de jarabe de yacón. Fue observado resultados próximos para grasa (0,58%), proteína total (2,4%) y acidez (2,5%) en relación con la Norma Internacional Codex *STAN 243 – 2003* Norma del Codex para leches fermentadas tipo kéfir. De la misma manera en estudios parecidos, estos valores fueron similares al relatado por (PARRA, 2014).

Tabla 17 – Determinación fisicoquímica promedio realizada en 100 g de bebida simbiótica funcional aceptable.

Ensayos	Promedio	Especificación del CODEX para leches fermentadas
Proteína ^(a)	2,4±0,015	min. 2,7%
Grasa	0,58±0,01	<10%
Acidez ^(b)	2,5±0,02	min. 0,6%

(a) (g/100g de muestra original) (factor: 6,25)

(b) (g/100g de muestra original) (expresado como ácido láctico)

En el Tabla 18 se observa los resultados de los ensayos de conteo de número de levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) viables en la bebida simbiótica funcional, que corresponde al tratamiento 12 horas de fermentación y 15% de jarabe de yacón. Fue observado resultados similares en relación a lo establecido en la Norma Internacional Codex *STAN 243 – 2003* para leches fermentadas ($\geq 10^4$ y $\geq 10^7$, respectivamente).

Tabla 18 – Promedio de recuento número de levaduras y bacterias ácido lácticas de la bebida simbiótica funcional aceptable.

Ensayos	Promedio	Especificación del CODEX para leches fermentadas
N. de levaduras (UFC/g)	$4,9 \times 10^4 \pm 0,40$	min. 10^4
N. de bacterias ácido lácticas (UFC/g)	$10 \times 10^7 \pm 0,75$	min. 10^7

5.2 Discusiones

En los resultados de determinación simultánea del tiempo de fermentación y concentración de jarabe de yacón en la bebida simbiótica funcional, se observó que los tratamientos con 12 horas de fermentación y concentración de jarabe de yacón 10, 12 y 15% fueron los más apropiados (Figura 5) por presentar características similares a la bebida láctea fermentada tipo kéfir, tales como pH y rendimiento de biomasa húmeda, que son factores considerados en la identificación de productos idóneos de fermentación (GARCIA , y otros, 2015). No observándose formación de fases, es decir, ausencia de precipitación de proteínas. Los tratamientos con 18 y 24h de fermentación presentaron menores valores de pH 4,18 a 4,27 y 4,25 a 4,29, respectivamente, en relación a los tratamientos con 12h de fermentación que estuvieron en el rango 4,70 a 4,81. Estos resultados guardan relación con lo relatado por ZIMMERMANN, y otros (2010), quienes sostienen que cuando el pH de la leche disminuye hasta 4,6 se induce a una coagulación de las caseínas con formación de fases.

En cuanto al rendimiento de biomasa húmeda fue observado en la Tabla 9 que el mayor incremento se dio en la concentración 15% de jarabe de yacón, y a esta misma concentración luego de 24h de fermentación, el incremento de biomasa húmeda fue el más alto. Similar comportamiento fue observado para las concentraciones de jarabe de yacón 12 y 10%. (ARÉVALO, y otros, 2008) en su estudio de concentración de inóculo y tiempo de fermentación para una bebida láctea fermentada observaron el mismo comportamiento, relatando que el incremento de porcentaje de biomasa húmeda fue el más alto para 48h de fermentación de 4 tiempos evaluados (12, 24, 36 y 48h) y 4% de concentración de inóculo, utilizando como medio de cultivo suero de leche. Estas diferencias en el tiempo de fermentación de ambos estudios se deberían a los diferentes medios de cultivo utilizado, para nuestro caso leche pasteurizada y jarabe de yacón. Estudios también relatan que el efecto simbiótico del yacón con *Lactobacillus* es responsable de incrementar los granos de kéfir. VEGAS, y otros (2013) analizaron el efecto simbiótico del extracto de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y *Lactobacillus plantarum* sobre el crecimiento de *Escherichia coli*

enteropatógena, observando que el *L. plantarum* presentó óptimo crecimiento a 15°Brix, manteniendo bajos niveles de *E. coli*, explicado por la capacidad del *L. plantarum* de fermentar azúcares libres, siendo inadecuado para la población de *E. coli*. A pesar que los mecanismos de cómo los oligosacáridos prebióticos son selectivamente metabolizados por miembros beneficiosos del microbiota intestinal, no están adecuadamente entendidos, sin embargo, existen relatos que la celobiosa estimula el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* y *Streptococcus thermophilus*, manteniendo bajas poblaciones de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* (VEGAS, y otros, 2013). Probablemente este efecto también ocurrió durante el proceso de fermentación de la bebida simbiótica funcional. A pesar del mayor incremento de biomasa con 15% de jarabe de yacón y 24h de fermentación, la formulación adecuada para la bebida simbiótica tipo kéfir fue 15% de jarabe de yacón y 12h de fermentación por no presentar separación de fases.

En la Figura 7 se observa la evolución del pH durante la fermentación de la bebida simbiótica funcional, disminuyendo con el tiempo. Comportamiento que también fue observado para productos con granos de kéfir (MARCHINI, y otros, 2016). En el presente estudio fue observado valores similares de pH 4,25, 4,29 y 4,25 para las diferentes concentraciones de jarabe de yacón 10, 12 y 15%, respectivamente. Sin embargo, fue la interacción tiempo de fermentación y concentración de jarabe de yacón que influyó en el pH, siendo más pronunciado ($p > 0,0048$) de 12h para 18h, disminuyendo de 4,81 para 4,18, este valor fue próximo a los valores relatados por algunos autores para pH de kéfir (MARCHINI, y otros, 2016). A partir de la observación visual, sin separación de fases, fue seleccionado el tiempo de fermentación (12h) para la bebida simbiótica funcional, siendo menor en relación a otros estudios (24 y 48h) que utilizaron granos de kéfir y en mayor concentración el inóculo (10 y 20%), posiblemente debido a que en nuestro estudio se utilizó jarabe de yacón, además de leche pasteurizada, influenciando en la disminución del tiempo de fermentación y pH. Efecto similar fue observado por VEGAS, y otros (2013), incremento de acidez y disminución de pH en extracto de yacón en concentración 15°Brix, utilizado como medio de cultivo para población de *L. plantarum*, probablemente debido a la presencia de azúcares residuales en el extracto de yacón, demostrando el efecto simbiótico del yacón y *L. plantarum* sobre el crecimiento de *E. coli* enteropatógena. PARRA (2014) en su estudio del efecto de la adición de yacón (*Smilax sonchifolius*) en las características fisicoquímicas, microbiológicas, proximales y sensoriales de yogur durante el almacenamiento bajo refrigeración, confirmó lo relatado por MUÑOZ (2010). Así mismo, menciona que este resultado se debió a los azúcares libres (fructosa, sacarosa,

etc.), los cuales son sustratos más fácilmente asimilables por parte de las bacterias lácticas durante el periodo de incubación y de almacenamiento. En relación a nuestra investigación en donde todos los tratamientos contenían jarabe de yacón en concentraciones 10, 12 y 15% fue observado en corto tiempo (12h, 18 y 24h) disminución de pH y separación de fases (18h y 24h), probablemente debido a que la inulina y el FOS del yacón estimularon el metabolismo de las bacterias lácticas ocasionando disminución de pH.

El dulzor juega un rol importante en los consumidores, pues la mayoría de las personas responden positivamente a la sensación del dulzor y existe una afinidad respecto al consumo de alimentos dulces que se remonta a la vida temprana. Asimismo, el jarabe de yacón es bajo en calorías, contiene abundante fructooligosacaridos e inulina considerados como azúcares no calóricos, que le confieren dulzor (RODRÍGUEZ, 2018), lo cual al ser adicionado en la bebida simbiótica funcional incrementa el dulzor del medio. Para el presente estudio no se consideró la evaluación de los atributos textura, sabor y color, puesto que previamente fueron evaluados, seleccionándose el tratamiento que no presentó separación de fases durante el tiempo de fermentación, equivalente a 12h de fermentación. Por esta razón se evaluó la aceptabilidad del dulzor de la bebida simbiótica funcional, que presentó valor promedio 8 (Tabla 15) en una escala numérica de nueve puntos para el tratamiento con 15% de jarabe de yacón en relación a los otros tratamientos 10 y 12% con valores de ponderación 4 y 6 me disgusta poco y me gusta poco, respectivamente. PARRA (2014) evaluó el efecto de la adición de jarabe de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en las características fisicoquímicas, microbiológicas, proximales y sensoriales del yogur durante el almacenamiento bajo refrigeración por 5 días. Dos formulaciones fueron propuestas, la primera denominada control con adición de sacarosa 8% y la segunda con adición de concentración de jarabe de yacón 3,5%. Los atributos evaluados fueron color, olor, sabor y aceptabilidad global, esta evaluación fue realizada con 20 panelistas, utilizándose una prueba hedónica con escala de 5 puntos. Los resultados reportaron que las calificaciones de los panelistas estuvieron sobre 4,5 respecto a los atributos aroma, color, y sobre todo aceptabilidad global. Concluyendo que la adición de concentración de jarabe de yacón fue aceptada sensorialmente en la elaboración del yogur como una alternativa al azúcar. Sin embargo, la textura del yogur debería mejorarse debido a que fue la calificación más baja (3,9). Comportamiento similar fue observado en nuestro estudio, tiempos de fermentación mayores a 12h presentaban consistencia con separación de fases. Así mismo, el color debería mejorarse tal como se observa en la Figura 5, debido al pardeamiento ocurrido

durante la elaboración del jarabe de yacón, observándose sedimento en la base del recipiente.

A la bebida simbiótica funcional, tratamiento con 12h de fermentación y 15% de jarabe de yacón, se le realizó el análisis fisicoquímico siguiendo el proceso establecido por la AOAC, indicado en el acápite 4.4.5.2 para proteína, grasa y acidez. Fue observado resultados próximos para grasa (0,58%), proteína total (2,4%) y acidez (2,5%) (Tabla 16) en relación con las especificaciones de la norma internacional Codex STAN 243.2003, Norma del Codex para leches fermentadas. Cabe resaltar el valor próximo de la proteína en relación a la Norma Codex para leches fermentadas. Una de las posibles explicaciones para la obtención de este valor podría tratarse de las modificaciones físicas, químicas y coloidales según el tipo de proceso a la que fue sometido como: pasteurización, fermentación, coagulación, etc. Además, es una de las más trascendentes características de las proteínas en ser susceptibles en ciertos cambios experimentados en sus propiedades naturales. Estos cambios pueden estar provocados por numerosos factores entre los que cuentan el calor, los ácidos y las bases fuertes. Estos cambios producen modificaciones en la molécula de la proteína (GARCIA , y otros, 2015). Esto se puede evidenciar claramente en los valores de pH y acidez citado por ZIMMERMANN, y otros (2010). Estos resultados se fortalecen con el relato de PARRA (2014) citado con anterioridad. Quién utilizó leche entera líquida ultrapasteurizada y adición 1% del cultivo iniciador y 3% de leche en polvo durante la formulación de yogurt con jarabe de yacón. La mezcla anterior lo dividió en dos partes: la primera denominada control con adición de sacarosa 8% y la segunda con adición de concentración de jarabe de yacón 3,5%. Seguidamente, fueron incubados a 43°C hasta alcanzar una mínima acidez titulable 0,6%. Luego se procedió a la caracterización proximal determinando proteína, grasa y acidez de acuerdo a la técnica 955.04/90 AOAC (1990). Los resultados obtenidos para yogurt con jarabe de yacón, proteína (2,87) y grasa (5,53), fueron comparados con el Codex Alimentarius Codex STAN 242-2003, proteína (mínimo 2,7%) y grasa (< 15%). Resultando acorde con lo recomendado por el Codex.

En la Tabla 18 se presenta el recuento de levaduras y resultados de viabilidad de las bacterias ácido lácticas después de dos días de almacenamiento bajo refrigeración a 5°C (tiempo transcurrido posterior a la elaboración hasta el análisis por laboratorio externo) del tratamiento que tuvo más aceptabilidad de dulzor. Estos valores, N° de levaduras $4,9 \times 10^4$ UFC/g y N° de bacterias acidolácticas 10×10^7 expresado en UFC/g, estuvieron dentro de lo establecido en la Norma Codex para leches fermentadas, Codex STAN 243-2003 ($\geq 10^4$



y $\geq 10^7$, respectivamente). Según la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA, 2008) citado por GALLINA, y otros (2012), la cantidad mínima viable para los probióticos debe estar situado en la faja de 10^8 a 10^9 UFC como recomendación diaria del producto listo para consumo, equivalente al consumo de 100g conteniendo 10^6 a 10^7 UFC/g. Considerando en nuestro estudio el valor obtenido en la bebida láctea fermentada tipo kéfir, N° BAL 10×10^7 , un consumo diario mínimo de 100 g estaría conteniendo niveles de probióticos indicados por la ANVISA. Los valores obtenidos en nuestro estudio también estuvieron próximos a lo presentado por PARRA (2014), quién reportó para yogurt con adición de concentrado de yacón 3,5% un valor de $3,92 \times 10^5$ UFC/g de recuento de bacterias ácido lácticas el quinto día de almacenamiento bajo refrigeración.

GALLINA, y otros (2012) señala que las principales especies microbianas con propiedades probióticas son pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Así mismo, la microbiota de los granos de kéfir está constituida principalmente por levaduras, bifidobacterias y bacterias ácido lácticas y ácidos acéticas (RODRÍGUEZ, 2018), que coexisten en una asociación simbiótica (PARRA, 2014) y cuya composición es compleja y variable (MARCHINI, y otros, 2016). Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos, la bebida láctea fermentada tipo kéfir mantenía a los dos días de almacenamiento bajo refrigeración el nivel recomendado diario del producto listo para consumo, siendo de importancia fisiológica para el consumidor.



CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- Se logró formular una bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón, sin formación de fases.
- La concentración de jarabe de yacón y tiempo de fermentación adecuados para la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir fue 15% y 12 horas respectivamente que fue determinado en función al pH del medio y evaluación de la aceptabilidad (dulzor) por los panelistas.
- El mayor rendimiento de biomasa húmeda más alta fue 1.91 g (sin separación de fases) que correspondió a 15% de concentración de jarabe yacón para 12 horas de fermentación.
- El pH apropiado para un tiempo de fermentación de 12 horas fue 4.70, pues para este valor, aún no ocurre precipitación de las proteínas (separación de fases).
- La formulación 12h de fermentación y 15% de jarabe de yacón, bebida simbiótica funcional con mayor aceptabilidad, presentó características fisicoquímicas y microbiológicas próximos a lo citado por la Norma Internacional Codex STAN 243. 2003, norma del Codex para leches fermentadas.

6.2 Recomendaciones

- Realizar estudio de la vida útil de la bebida simbiótica funcional tipo kéfir
- Utilizar una mejor técnica para la obtención de jarabe de yacón, de manera que pueda mejorarse el color.
- Utilizar algunos estabilizantes para resolver la separación de fases.
- Considerar otros atributos de aceptabilidad de la bebida simbiótica funcional tipo kéfir tales como color, sabor y textura en los siguientes estudios.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALVAREZ, Pedro, y otros. 2008. Prebiótico Inulina/Oligofruktosa en la Raíz del Yacón (*Smallanthus sonchifolius*), Fitoquímica y estandarización como Base de Estudios Preclínicos y Clínicos. s.l. : Rev Gastroenterol Perú, 2008, Vol. 28, págs. 22-27.

ARÉVALO, Fermín y ARIAS, Gladys. 2007. Estudio comparativo del efecto de las temperaturas constante y variable ambiente en la producción de biomasa proveniente de la microbiota del grano de kéfir. Lima : Ciencia e investigación Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, 2007, Vol. 10.

ARÉVALO, Humberto y ARIAS, Gladys. 2008. Determinación de la concentración de inóculo y tiempo de fermentación, utilizando microbiota de los granos de kéfir como agente biológico y suero de leche como sustrato. Perú : Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, 2008, Vol. 2.

BENITES, Ruth Marisol. 2018. Temperatura, humedad ambiental y algunas características ganaderas en la producción, pH y densidad de la leche del vacuno (*Bos taurus*) en Tamburco, Apurímac . Apurímac : UNAMBA, 2018.

BERNAL, Camila Andrea, DÍAZ, Consuelo y GUTIÉRREZ, Carolina. 2017. Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. s.l. : Revista chilena de nutrición, 2017, Vol. 44.

BLANCO, Patricia. 2015. Caracterización de bacterias de *Streptococcus thermophilus* aisladas de leche cruda bovina, ovina y caprina. Uruguay : Tesis de licenciatura en bioquímica, 2015, págs. 1-32.

CASTAÑEDA, Carlos. 2018. Actualización en prebióticos. Ambato : Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Regional Autónoma de Los Andes, 2018, Vol. 90, págs. 1-16.

CASTILLO, Augusto y CHAMY, Rolando. 2010. Producción de inulina por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. s.l. : Scientia Agropecuaria, 2010, Vol. 1, págs. 235-245.



CICOTELLO, Joaquín. 2016. Leuconostoc en la industria de alimentos: comportamiento en condiciones de estrés tecnológico. Argentina: Instituto de Lactología Industrial (Universidad Nacional del Litoral – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Facultad de Ingeniería Química, 2016, págs. 1 - 4.

CONTRERAS , Elizabet Prado y PURISACA, Johanna Paola. 2018. Elaboración y evaluación de bebida funcional a partir de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) y piña (*Ananas comosus*) endulzado con stevia. Chimbote- Perú : Tesis para obtener el título profesional de ingeniero agroindustrial, 2018.

CORZO, Nasario, y otros. 2015. *Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos.* s.l. : Nutrición Hospitalaria, 2015, págs. 99-118.

DALLA, Osmar Roberto, MOTA, Graziela y GASPAR, Reinaldo. 2018. Evaluación sensorial del kéfir sabor a fresa y ciruela. s.l. : R. Bras. Agrociencia, Pelotas, 2018, Vol. 14, págs. 77-85.

FERRARI, Alejandro, VINDEROLA, Gabriel y WEIL, Ricardo. 2020. Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura. Argentina : Instituto Donine, 2020.

GALLINA, Darlila, y otros. 2012. Caracterización de bebida obtenida a partir de leche fermentada simbiótica adicionada con pulpa de guayaba y evaluación de la viabilidad de las bifidobacterias. s.l. : Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”, 2012, Vol. 386, págs. 45-54.

GARCIA , Jessica Carolina y HERNANDEZ, Rosa Carolina. 2015. Fermentación de leche descremada UHT a partir de gránulos de kéfir. s.l. : Para optar al grado de licenciada en química y farmacia , 2015.

GARCIA , Jessica Graciela y HERNANDEZ, Rosa Carolina. 2015. Fermentación de leche descremada UHT a partir de gránulos . El salvador : Para optar al grado de licenciada en química y Farmacia, 2015.

Guillot, César Camilo. 2018. Actualización en prebióticos. 2018, págs. 4-6.



GUTIERREZ, Humberto y DE LA VEGA, Román. 2010. Análisis y diseño de experimentos . México : McGrawHill, 2010.

KINA, Melissa . 2016. Optimización de los procesos de extracción de Fructooligosacáridos y clarificación del extracto acuoso de yacón (*Smallanthus Sonchifolius* Poepp & Endl.). Lima - Perú : Tesis para optar el título de ingeniero en industrias alimentarias, 2016.

MAGO, Ysabel, y otros. 2015. Maduración de Queso de Cabra con Cepa Autóctona de *Leuconostoc mesenteroides* Aislada de Queso Artesanal. s.l. : Rev. Fac. Cs. Vets. Industria Animal, 2015, Vol. 56, págs. 3-9.

MARCHINI, Mario, y otros. 2016. Estudio exploratorio de las condiciones de fermentación de un inóculo de kéfir. s.l. : Tecnología Láctea Latinoamericana , 2016, Vol. 92, págs. 56-60.

MEJÍA, Reina Andrea. 2015. Impregnación al vacío de fructooligosacáridos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) en manzana. Lima-Perú : Tesis para optar el título de ingeniero de industrias alimentarias , 2015.

MONAR, Miguel. 2014. Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. Ecuador : Avances en Ciencias e Ingenierías, 2014, Vol. 6, págs. 60-66.

MUÑOZ, Ana. 2010. Yacón *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H.Rob. Perú : MBA/ Química Farmacéutica consultor PBD-Perubiodiverso, 2010.

OLIVEIRA, Gabriel y GONZALES , Inmaculada. 2016. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. s.l. : Endocrinología y Nutrición, 2016, Vol. 63, págs. 248-294.

OLIVO, Diana, y otros. 2017. Actividad biológica y potencial terapéutico de los probióticos y el kefirán del grano de kéfir. s.l. : Revista Iberoamericana de Ciencias, 2017, Vol. 4, págs. 49-56.

PARRA, Ricardo. 2014. Efecto de la adición de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en las características fisicoquímicas, microbiológicas, proximales y sensoriales de yogur durante el



almacenamiento bajo refrigeración. s.l. : LIMENTECH CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA, 2014, Vol. 12, págs. 5-14.

PORCEL, Jaime Sanchez. 2011. Identificación de las especies del género Candida en gestantes con candidiasis vulvo vaginal que acuden al Hospital Gineco-obstétrico. s.l. : Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, 2011, págs. 210-257.

PRETELL, Adelaida Medalid y URRACA, Elena Matilde. 2012. Características fisicoquímicas y aceptabilidad general de un kefir de leche de vaca (*Bos taurus*) y de cabra (*Capra hircus*). s.l. : Pueblo cont., 2012, Vol. 23.

PRETELL, Adelaida y URRACA, Elena. 2012. Características fisicoquímicas y aceptabilidad general de un kefir de leche de vaca (*Bos taurus*) y de cabra (*Capra hircus*). s.l. : Pueblo cont., 2012, Vol. 23, págs. 145-156.

RAMIREZ, Benites, y otros. 2016. Producción de biomasa en la fermentación de leche por gránulos de kéfir. s.l. : Revista del centro de graduados e investigación. Instituto Tecnológico de Mérida, 2016, Vol. 31, págs. 187 – 188.

RAMOS, David Juan. 2016. Influencia de la despolimerización de los fructooligosacáridos en la estructura general de la raíz de yacón (*Polymnia sonchifolia*) almacenada. Puno - Perú : s.n., 2016.

ROBINSON, Ricardo. 1987. Microbiología Lactológica Volúmen I. Microbiología de la leche. Zaragoza : Acribia S.A., 1987.

RODRÍGUEZ, Irene María. 2018. Estudio de pre factibilidad para la instalación de una planta productora de endulzante de yacón (*Smallanthus Sonchifolius*) liofilizado en polvo para el mercado local. Lima – Perú : Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Industrial, 2018.

RUIZ, Mariuxi Viviana, y otros. 2017. Beneficios del kéfir para la salud. s.l. : Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento, 2017, Vol. 1, págs. 296-311.



SAMPABLO, Virginia. 2017. Leches fermentadas: tradición e innovación. s.l. : Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 2017, págs. 1-21.

SUÁREZ, Caridad, GARRIDO, Norge Antonio y GUEVARA, Carmen Amarilys. 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. [trad.] 50. s.l. : Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)., 2016, Vol. 1, págs. 20-28.

TRECASTRO, Eva María y BERNABEU, Josep. 2015. *Alimentos funcionales: ¿necesidad o lujo?* s.l. : Revista Española de Nutrición Humana y Dietética, 2015, Vol. 19(1), págs. 1 - 3.

VALENZUELA, Alfonso, y otros. 2014. Alimentos funcionales, nutraceúticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? s.l. : Rev Chil Nutr, 2014, Vol. 41, págs. 198-204.

VALENZUELA, AMELIA, SANHUEZA, JOEL y Morales , Ignacio. 2014. Alimentos funcionales, Nutraceúticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? 2014, págs. 198-204.

VEGAS, Carlos, y otros. 2013. Efecto simbiótico del extracto de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*. s.l. : Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, 2013, Vol. 16, págs. 77-82.

ZIMMERMANN, Stein y ESPONOZA, Ruiz. 2010. Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas: efecto de modificaciones inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos. Mexico : Departamento de Ingeniería Química, alimentos y ambiental, 2010, Vol. 4.



ANEXOS



ANEXO 1. Determinación simultánea del tiempo de fermentación y concentración jarabe de yacón

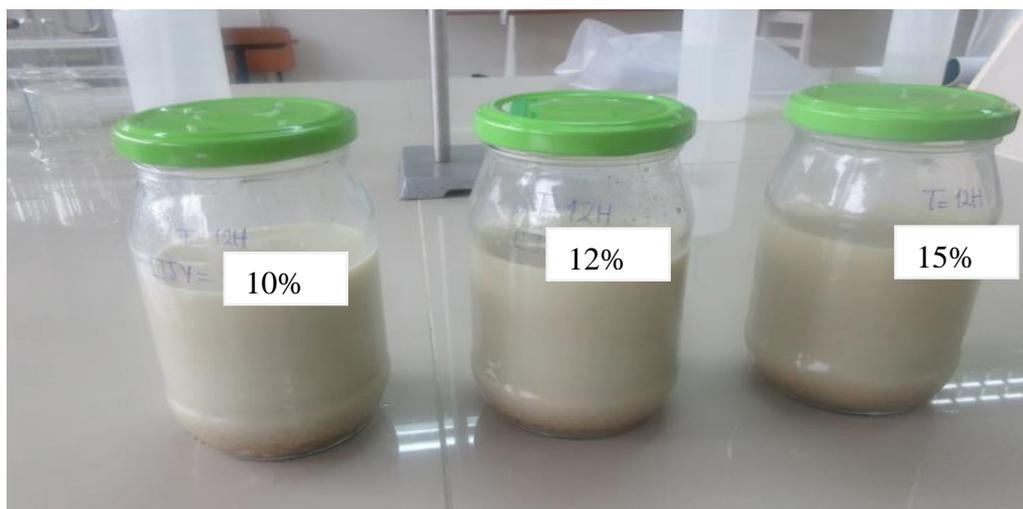


Figura 8 — Consistencia de bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe yacón con 12 horas de fermentación con concentraciones de 10, 12 y 15% de jarabe de yacón, observado sin formación de fases.

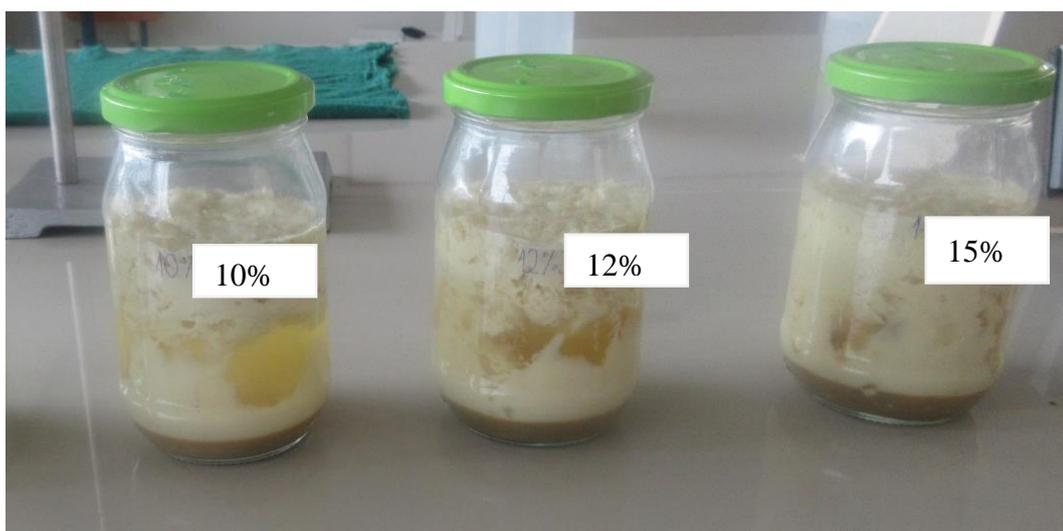


Figura 9 — Consistencia de bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe yacón con 18 horas de fermentación con concentraciones de 10, 12 y 15% de jarabe de yacón, observado con formación de fases.

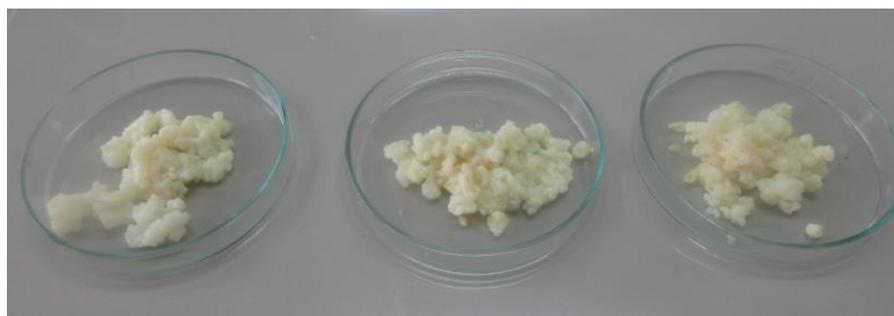


Figura 10 – Granos de kéfir 12h de fermentación luego de ser filtradas, correspondiente a concentraciones de 10, 12 y 15% de jarabe de yacón respectivamente listas para ser almacenadas o para ser usadas en nuevas fermentaciones.

ANEXO 2. Resultados de rendimiento biomasa húmeda en la formulación de una bebida simbiótica funcional en gramos y porcentaje.

Tabla 19 – Rendimiento de biomasa húmeda (g) al adicionar concentración de jarabe de yacón respecto al tiempo de fermentación (3 repeticiones)

Biomasa	Concentración de jarabe de Yacón	Tiempo de fermentación		
		12 horas	18 horas	24 horas
Rendimiento peso húmedo (g)	10%	0,6936	1,2032	1,7374
		1,9187	2,0023	3,5468
		1,7830	1,6850	2,5287
	Total	1,4651	1,6301	2,6043
	12%	1,9402	2,5394	1,9234
		1,7561	1,7768	2,3411
		1,5120	1,4992	2,8885
	Total	1,7361	1,9384	2,3843
	15%	1,0783	2,6357	2,4253
		2,6572	2,0338	3,0632
		2,0219	3,1147	2,3568
	Total	1,9191	2,5947	2,6151



Tabla 20 – Rendimiento de biomasa húmeda (%) al adicionar concentración de jarabe de yacón respecto al tiempo de fermentación (3 repeticiones)

Biomasa	Concentración de jarabe de Yacón	Tiempo de fermentación		
		12 horas	18 horas	24 horas
Rendimiento peso húmedo (%)	10%	2,0708%	12,0200%	17,2200%
		19,1242%	20,0136%	35,2039%
		26,6798%	16,7845%	25,1556%
	Total	15,9583%	16,2727%	25,8598%
	12%	9,3702%	25,3400%	19,0600%
		17,5034%	17,6655%	23,3869%
		21,3816%	14,9140%	28,7980%
	Total	16,0851%	19,3065%	23,7483%
	15%	10,5814%	26,1100%	24,2100%
		26,4962%	20,2626%	30,5754%
		20,1770%	31,0476%	23,5146%
	Total	19,0849%	25,8067%	26,1000%

Tabla 21 – Resúmenes de análisis estadístico (ANOVA) de rendimiento de biomasa obtenido en la bebida simbiótica funcional formulada.

	T1=12H	T2=18H	T3=24H	Total
A1=10%				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	4.3953	4.8905	7.8129	17.0987
Promedio	1.4651	1.6302	2.6043	1.8999
Varianza	0.4510	0.1619	0.8228	0.6432
A2=12%				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	5.2083	5.8154	7.153	18.1767
Promedio	1.7361	1.9385	2.3843	2.0196
Varianza	0.0461	0.2901	0.2343	0.2251
A3=15%				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	5.7574	7.7842	7.8443	21.3859



Promedio	1.9191	2.5947	2.6148	2.3762
Varianza	0.6312	0.2933	0.1520	0.3867
Total				
Cuenta	9	9	9	
Suma	15.361	18.4901	22.8102	
Promedio	1.7068	2.0545	2.5345	
Varianza	0.3212	0.3684	0.3149	

ANEXO N° 3. Medición de pH de fermentación de la bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón.

Tabla 22 – Resultados de medición de pH al término de cada tiempo de fermentación con adición de 10, 12 y 15% jarabe de yacón (3 repeticiones)

Concentración de jarabe de yacón	Tiempo de fermentación		
	12 horas	18 horas	24 horas
10%	4.82	4.19	4.3
	4.68	4.17	4.26
	4.78	4.16	4.27
12%	4.85	4.31	4.23
	4.76	4.22	4.36
	4.77	4.25	4.25
15%	4.69	4.3	4.27
	4.71	4.3	4.23
	4.7	4.4	4.24



Tabla 23 – Resumen de análisis estadístico (ANOVA) de la medición de pH obtenido en la bebida simbiótica funcional formulada.

RESUMEN	12 horas	18 horas	24 horas	Total
Concentración 10%				
GL	3	3	3	9
Suma	14,28	12,52	12,83	39,63
Promedio	4,76	4,173	4,2767	4,4033
Varianza	0,0052	0,0002	0,0004	0,0750
Concentración 12%				
GL	3	3	3	9
Suma	14,38	12,78	12,84	40
Promedio	4,7933	4,26	4,28	4,4444
Varianza	0,0024	0,0021	0,0049	0,0709
Concentración 15%				
GL	3	3	3	9
Suma	14,1	13	12,74	39,84
Promedio	4,70	4,3333	4,2467	4,4267
Varianza	1E-04	0,0033	0,0004	0,0444
Total				
GL	9	9	9	
Suma	42,76	38,3	38,41	
Promedio	4,7511	4,2556	4,2678	
Varianza	0,0036	0,0062	0,0017	

ANEXO N° 3: Prueba de aceptabilidad de tratamiento que no contiene separación de fases correspondiente a 12h de fermentación y 10, 12 y 15% de jarabe de yacón.

Nombres y apellidos.....

Fecha.....N° de muestra.....

Producto: “Bebida simbiótica funcional con granos de kéfir y jarabe de yacón”

Pruebe el producto que se presenta ante usted indique con una cruz su grado de aceptabilidad.

Escala	289	459	354
Me gusta muchísimo (9)			
Me gusta mucho (8)			
Me gusta moderadamente (7)			
Me gusta poco (6)			
Ni me gusta, ni me disgusta (5)			
Me disgusta poco (4)			
Me disgusta moderadamente (3)			
Me disgusta mucho (2)			
Me disgusta muchísimo (1)			

Comentario:.....

Muchas gracias por su colaboración





Figura 11 — Tratamiento sin separación de fases correspondiente a 12h de fermentación para concentraciones de 10, 12 y 15% de jarabe de yacón, previamente acondicionada para la evaluación de los panelistas en laboratorio de Química de los Alimentos.



Figura 12 — Estudiantes de la Escuela Académica Profesional Ingeniería Agroindustrial como panelistas en la evaluación de la aceptabilidad (dulzor) de la bebida simbiótica funcional.

Tabla 24 – Degustación con concentración de jarabe yacón al 10%

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Me disgusta mucho	7	17,5	17,5	17,5
	Me disgusta moderadamente	7	17,5	17,5	35,0
	Me disgusta poco	13	32,5	32,5	67,5
	Ni me gusta ni me disgusta	5	12,5	12,5	80,0
	Me gusta poco	5	12,5	12,5	92,5
	Me gusta moderadamente	2	5,0	5,0	97,5
	Me gusta mucho	1	2,5	2,5	100,0
Total		40	100,0	100,0	

Tabla 25 – Degustación con concentración de jarabe yacón al 12%

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Me disgusta poco	3	7,5	7,5	7,5
	Ni me gusta ni me disgusta	11	27,5	27,5	35,0
	Me gusta poco	11	27,5	27,5	62,5
	Me gusta moderadamente	9	22,5	22,5	85,0
	Me gusta mucho	4	10,0	10,0	95,0
	Me gusta muchísimo	2	5,0	5,0	100,0
	Total		40	100,0	100,0

Tabla 26 – Degustación con concentración de jarabe yacón al 15%

		Frecuencia	%	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Me disgusta moderadamente	1	2,5	2,5	2,5
	Me disgusta poco	1	2,5	2,5	5,0
	Ni me gusta ni me disgusta	3	7,5	7,5	12,5
	Me gusta moderadamente	5	12,5	12,5	25,0
	Me gusta mucho	20	50,0	50,0	75,0
	Me gusta muchísimo	10	25,0	25,0	100,0
	Total		40	100,0	100,0

Tabla 27 — Rangos en la prueba de Krukall-Wallis

	Dulzor	N	Rango promedio
CENTRACIÓN DE JARABE YACÓN	Dulzor 10%	40	30,28
	Dulzor 12%	40	62,93
	Dulzor 15%	40	88,30
	Total	120	

Tabla 28 — Recuento del número de levaduras y bacterias ácido lácticas en la muestra aceptable por dos repeticiones obtenida en la Universidad Nacional Agraria la Molina.

Ensayos	Promedio	Res.1	Res. 2	CODEX
N. de levaduras (UFC/g)	$4,9 \times 10^4 \pm 0.40$	$5,3 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	min. 10^4
N. bacterias ácido lácticas (UFC/g)	$10 \times 10^7 \pm 0.75$	$9,5 \times 10^7$	11×10^7	min. 10^7