



## **Desarrollo y estabilidad fisicoquímica de una bebida fermentada y carbonatada utilizando jugo de uva y granos de kéfir de agua**

### **Desenvolvimento e estabilidade físico-química de uma bebida fermentada e carbonatada usando suco de uva e grãos de kefir de água**

#### **Samarha Pacheco Wichello**

Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Engenharia de Alimentos, Alto Universitário,  
S/N Guararema, Alegre - 29500-000 - Espírito Santo, Brasil  
samarha.wichello@edu.ufes.br

#### **Lara Oliveira Mozer**

Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Engenharia de Alimentos, Alto Universitário,  
S/N Guararema, Alegre - 29500-000 - Espírito Santo, Brasil  
lara.mozer@edu.ufes.br

#### **Klinger Vinícius de Almeida**

Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Engenharia de Alimentos, Alto Universitário,  
S/N Guararema, Alegre - 29500-000 - Espírito Santo, Brasil  
klinger\_vinicius@yahoo.com.br

#### **Victória Correa da Costa**

Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Engenharia de Alimentos, Alto Universitário,  
S/N Guararema, Alegre - 29500-000 - Espírito Santo, Brasil  
victoriacorrea.costa@outlook.com

#### **Luciano José Quintão Teixeira**

Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Engenharia de Alimentos, Alto Universitário,  
S/N Guararema, Alegre - 29500-000 - Espírito Santo, Brasil  
luqteixeira@yahoo.com.br

#### **RESUMEN**

El kéfir es una bebida fermentada que se ha introducido en Brasil en los últimos años. Los granos de kéfir de agua están compuestos por una asociación simbiótica de levaduras, bacterias del ácido láctico, bacterias ácido-acéticas, entre otros microorganismos. Estos cultivos utilizan azúcar moreno como fuente de energía durante el proceso de fermentación. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y analizar la estabilidad fisicoquímica de la bebida fermentada y carbonatada de forma natural, utilizando granos de kéfir de agua durante el almacenamiento. El jugo de uva entero se utilizó en el aromatizante y la gasificación del producto se realizó mediante una segunda fermentación en un recipiente cerrado. Los resultados muestran que los microorganismos permanecen activos durante el almacenamiento del producto que, por un lado, porque son estos microorganismos los que garantizan el potencial probiótico de esta bebida y, por otro lado, limitan la vida útil del producto ya que la fermentación continúa ocurriendo durante todo el tiempo de almacenamiento, incluso cuando se almacena a temperatura refrigerada. Por lo tanto, los niveles de alcohol, acidez volátil y concentración de CO<sub>2</sub> aumentan durante el tiempo de almacenamiento. Se necesitan más estudios, sin embargo, como resultado anterior, se puede afirmar que es posible tener una vida útil de al menos 21 días, siempre y cuando el almacenamiento se produzca bajo refrigeración.

**Palabras clave:** Kéfir, Probióticos, Fermentación, Cinética.



## 1 INTRODUCCIÓN

El kéfir es una bebida fermentada, ácida, ligeramente alcohólica, producida a partir de granos que contienen una población relativamente estable de microorganismos simbióticos, inmersos en una matriz compuesta de polisacáridos y proteínas (YOVANOUDI *et al.*, 2013), tales características atribuyen al kéfir el potencial probiótico. Existen básicamente dos tipos de kéfir: kéfir de agua (LAUREYS; DE VUYST, 2017) y kéfir de leche (CONTIM *et al.*, 2018).

El atractivo de los alimentos llamados probióticos y simbióticos, ha crecido a lo largo de los años, consolidando el mercado de alimentos funcionales, ya que, estos alimentos y bebidas cuando se consumen en cantidad adecuada, ofrecen numerosos beneficios promoviendo un estilo de vida más saludable.

Entre los efectos beneficiosos se puede citar la propiedad de reponer el microbiota intestinal desequilibrada, modulando favorablemente la respuesta inmune del huésped, disminuyendo los procesos de putrefacción, reduciendo la acumulación de sustancias nocivas en el tracto gastrointestinal, y también puede indicar una mejora potencial en la salud ósea al aumentar la absorción de calcio en el intestino grueso (FERREIRA, 2012).

Así, los alimentos funcionales son una tendencia que ha llegado para quedarse en la industria alimentaria debido a la prueba científica de las relaciones entre estos alimentos y la salud y, sobre todo, y también por el creciente interés del consumidor por nuevas alternativas que prevengan enfermedades crónicas no transmisibles, problemas intestinales, satisfagan la demanda de veganos, intolerantes a la lactosa, individuos que tienen dietas basadas en plantas y consumidores que buscan un reemplazo de refrescos con otro producto con características y sabor similares y que, a diferencia de los refrescos, siguen siendo buenos para la salud.

El control del binomio tiempo x temperatura es esencial para cualquier proceso de fermentación en la industria alimentaria. En el caso de la producción de kéfir, las características finales del producto pueden modificarse dependiendo de las condiciones del proceso. Un tiempo de fermentación más largo a temperatura ambiente dará como resultado un producto más ácido, mientras que un período de almacenamiento más largo a temperatura de refrigeración dará como resultado un producto con mayor contenido de alcohol (FERREIRA, 2001).

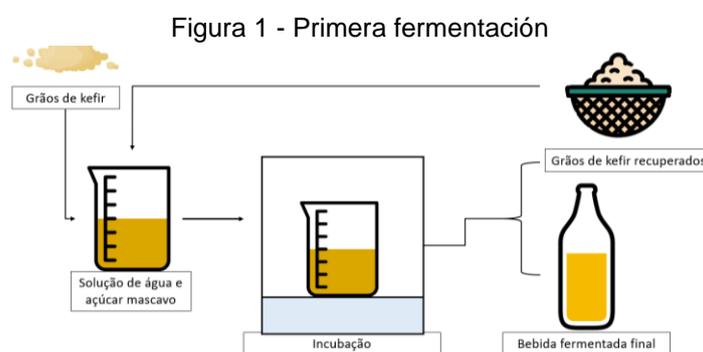
Además, es necesario considerar la alteración sensorial del producto durante el almacenamiento debido a la reducción del contenido de azúcar, el aumento de la acidez,

el contenido de alcohol y la concentración de CO<sub>2</sub> que puede resultar en la ruptura del envase debido al aumento de la presión. Todo esto altera la percepción de calidad por parte del consumidor, requiriendo así un mayor control por parte de la industria.

Así, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una bebida natural, aromatizada con jugo de uva entero, carbonatado naturalmente, potencialmente probióticos debido al uso de granos de kéfir de agua, y analizar su estabilidad fisicoquímica durante su almacenamiento a temperatura refrigerada.

## 2 METODOLOGÍA

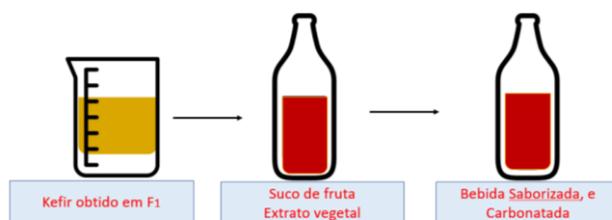
La bebida fermentada con granos de kéfir se produjo a partir de dos fermentaciones (F 1 y F 2), donde primero los granos de kéfir se inocularon aeróbicamente (F1) en solución acuosa azucarada que contenía 10% (m / v) de azúcar moreno y 5% (m / v) de granos de kéfir en relación con el volumen de 1L de agua mineral, Bajo una temperatura de 32°C durante un tiempo de 24 horas, Figura 1. Estas condiciones se obtuvieron con ensayos previos utilizando diferentes concentraciones de azúcar y temperatura de fermentación.



Fuente: Los autores

Al final de F1, los granos de kéfir se drenaron del líquido (agua de kéfir) de la fermentación y se agregaron al jugo de uva entero y F 2 en anaerobiosis (Figura 2). Las pruebas previas se hicieron con los sabores de uva, manzana y naranja. El equipo de investigadores optó por el jugo de uva debido a la similitud sensorial con la Uva Fanta, que tiene una buena aceptación por parte de los consumidores de bebidas carbonatadas sin alcohol. La anaerobiosis de F2 se garantizó utilizando botellas cerradas de PET.

Figura 2 – Aromatización natural y carbonatación del kéfir mediante fermentación F2



Fuente: autores.

Después de la segunda fermentación, las bebidas fermentadas se almacenaron a 7 ° C en un refrigerador, se realizó una caracterización fisicoquímica y microbiológica en el tiempo cero y se iniciaron análisis fisicoquímicos durante todo el tiempo de almacenamiento.

Los análisis fisicoquímicos fueron: pH, acidez titulable total (TTA), acidez volátil (AV), contenido de alcohol (TA) y contenido total de azúcar (TA). Para el análisis de pH, se realizó una lectura de potenciómetro (marca Metrohm, modelo 826 pH móvil) a temperatura ambiente. El análisis de la acidez titulable total (TTA) se realizó a partir del extracto fermentado por titulación con 0,1 N NaOH, utilizando un medidor de pH de sobremesa hasta pH 8,3. La determinación del azúcar total se realizó de acuerdo con el protocolo para la determinación de azúcares reductores por el método Somogyi-Nelson, (MALDONADE et al. 2013).

Los datos se analizaron mediante Análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de regresión no lineal para datos cuantitativos y la prueba de Tukey para datos que no podían ajustarse a un modelo de regresión.

### Análisis microbiológico

El recuento de unidades formadoras de colonias de bacterias del ácido láctico (BAL) se realizó utilizando agar MRS y placas profundas según SILVA et al. (2007).

Para el conteo de coliformes, utilizamos 3M™ Petrifilm™ para el conteo de coliformes, que es un sistema de medio de cultivo listo para la muestra que contiene nutrientes de bilis roja violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias en muestras de alimentos y bebidas.

## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Poco después de la fermentación (F2), la bebida fermentada, saborizada y carbonatada (tiempo cero) se caracterizó en relación con el recuento de bacterias del ácido láctico, sólidos solubles, contenido de alcohol, como se ilustra en la Tabla 1.

Tabla 1 – Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la bebida

Parámetros	Aspecto general (promedio)
pH	3,18
Sólidos solubles	5.0°Brix
Graduación	1°GL
Coliformes totales	Ausencia
Bacterias del ácido láctico	1 x 107 UFC/g

Fuente: Los autores.

La caracterización fisicoquímica y microbiológica inicial, es decir, la realizada en el momento cero presentó los datos como se esperaba: un producto de alta acidez, ligeramente alcohólico, ausencia de coliformes totales que indican ser una bebida segura y alto recuento de bacterias lácticas que indican un posible efecto probiótico.

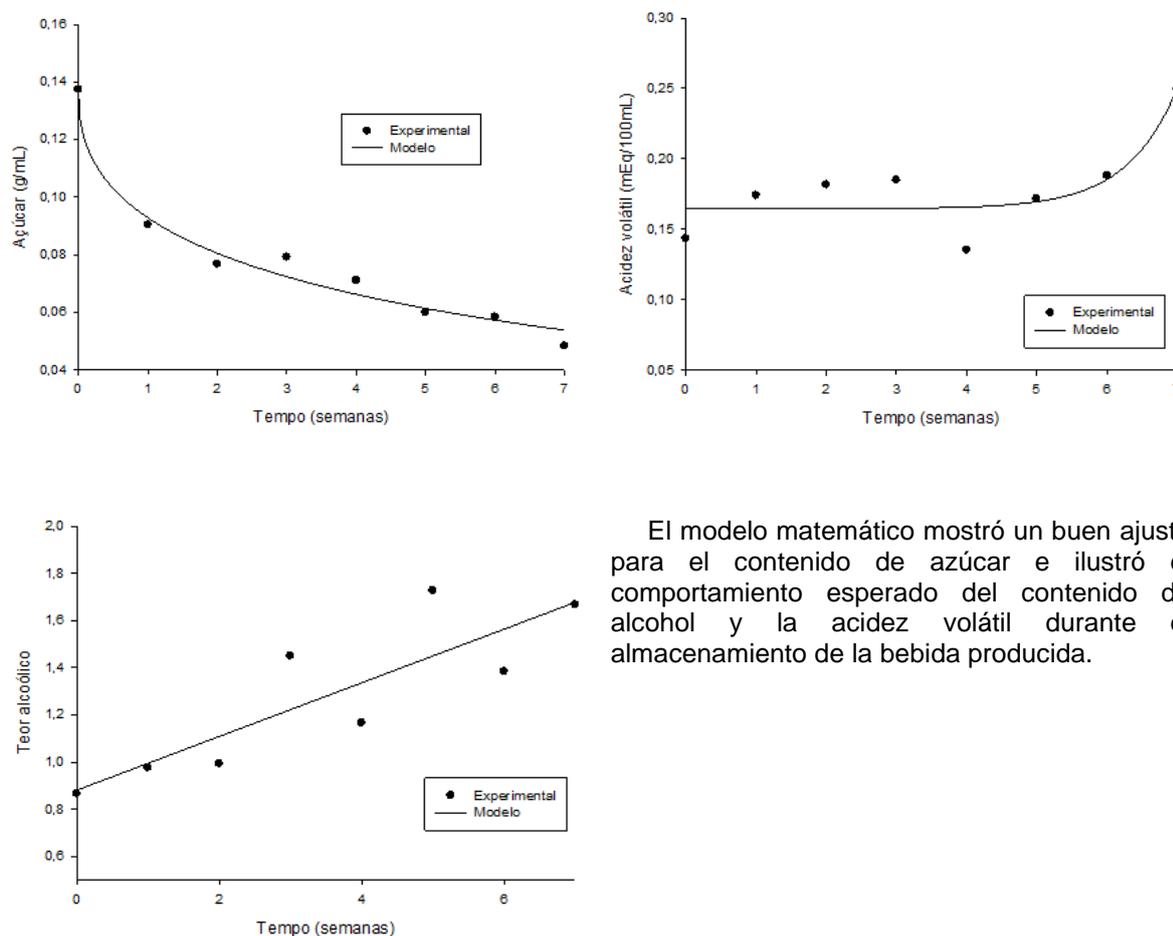
En cuanto a la estabilidad fisicoquímica, el tiempo de almacenamiento influyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en todas las variables analizadas. Fue posible ajustar un modelo matemático de regresión para las variables contenido total de azúcar, acidez volátil y contenido de alcohol en función del tiempo de almacenamiento, como se ilustra en la Tabla 2 y la Figura 3.

Tabla 2 - Ecuaciones ajustadas y coeficientes de determinación (R2) para las variables analizadas

Variable	Ecuación ajustada	R2
Contenido de azúcar	$\hat{y} = 0,1370 e^{-0,3895 t^{0,4501}}$	0,9766
Acidez volátil	$\hat{y} = 0,1644 + 0,000004513 e^{1,4068 t}$	0,7394
Graduación	$\hat{y} = 0,8808 + 0,1137 t$	0,7273

Fuente: Los autores

Figura 3 - Curvas cinéticas de las variables analizadas y ajustadas



El modelo matemático mostró un buen ajuste para el contenido de azúcar e ilustró el comportamiento esperado del contenido de alcohol y la acidez volátil durante el almacenamiento de la bebida producida.

Fuente: Los autores

El kéfir es una bebida compuesta por microorganismos activos que utilizan el azúcar presente en el sustrato como fuente de energía para sobrevivir y multiplicarse. Durante el almacenamiento, se esperaba una reducción parcial de la actividad microbiana, reduciendo el proceso de fermentación y la producción de compuestos a partir de ella (etanol, CO<sub>2</sub>, compuestos volátiles y ácido acético). Al analizar los resultados obtenidos verificamos un aumento continuo en el contenido de alcohol y acidez volátil, simultáneo a la disminución en el contenido de azúcares presentes en la bebida, datos que confirman que los microorganismos presentes en la bebida están activos durante todo el almacenamiento y que el proceso de fermentación continúa durante el almacenamiento de la bebida. Esto es bueno, por un lado, ya que los microorganismos son responsables del potencial probiótico, pero por otro lado reduce la

vida útil del producto al cambiar las características sensoriales y aumentar la presión en la botella.

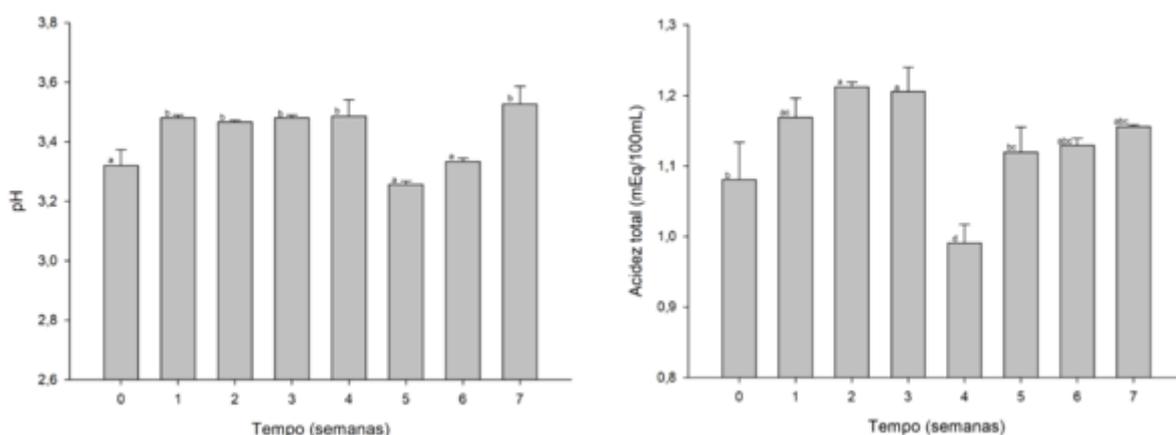
Los datos están de acuerdo con las expectativas, porque incluso bajo refrigeración sigue habiendo una fermentación principalmente de levaduras y bacterias acéticas. Así notamos un consumo de azúcar durante todo el almacenamiento, aumento del contenido de alcohol y acidez volátil. La acidez volátil es característica de la fermentación acética que conduce al rechazo sensorial del producto. Aumenta significativamente a partir de la quinta semana.

Al realizar los análisis, se encontró que la botella analizada en la última semana, cuando se compara con la botella abierta en la primera semana, presentó un exceso de carbonatación que dificulta su apertura, con pérdida de líquido en el llamado efecto de brote. Además, en la última semana de almacenamiento se notó un aroma de fermentación que se asemeja a la cerveza afrutada.

Por lo tanto, los resultados indican una vida útil que varía entre 4 a 5 semanas. Si se utiliza un buen margen de seguridad, se puede indicar una vida útil de al menos 21 días para la bebida almacenada bajo refrigeración. Sin embargo, es necesario hacer un estudio específico de análisis sensorial y análisis microbiológico para establecer la vida útil del kéfir de agua aromatizado con jugo de fruta que tiene mayor precisión y asertividad.

No fue posible ajustar un modelo de regresión para las variables pH y acidez total y, en este caso, optamos por comparar los diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey.

Figura 4 - Granos de kéfir de agua



Fuente: autores.



Las columnas que tienen la misma letra en común indican medias que no difieren entre sí ( $p > 0,05$ ) por la prueba de Tukey, se observa que no hay diferencia significativa en el pH y la acidez total entre la primera y la séptima semana.

#### 4 CONCLUSIÓN

Se concluye que durante el tiempo de almacenamiento realizado a una temperatura de 7°C, los microorganismos presentes en la bebida permanecen activos y fermentando.

Fue posible establecer un modelo matemático que explica la variación de los parámetros a lo largo del tiempo de almacenamiento para las variables dependientes: azúcar total, contenido de alcohol y acidez volátil.

El kéfir de uva mostró ausencia de coliformes que indican seguridad alimentaria y un alto recuento de bacterias del ácido láctico, lo que indica un potencial probiótico para este tipo de bebida.

Después de 5 semanas de almacenamiento de la bebida, se vuelve muy ácida y supercarbonatada, lo que puede llevar a un rechazo por parte del consumidor y presentar un riesgo de explosión de la botella o riesgo de aparición del efecto goshing durante la apertura de esta.

En un análisis previo y adoptando un margen de seguridad fue posible sugerir una vida útil de 21 días, pero es necesario hacer estudios adicionales más profundos incluyendo análisis sensoriales y microbiológicos para establecer con mayor precisión y asertividad la vida útil de esta bebida.

## REFERENCIAS

CARNEIRO, Raphaela. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir**. UFMG. 01 de out de 2010.

CONTIM, L. S. R.; OLIVEIRA, L. M. A; NETO, J.C. Avaliação microbiológica, físico-química e aceitação sensorial do kefir com polpa de graviola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, p. 1-9, 2018.

DA SILVA, Neusely et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Editora Blucher, 2017.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados**: Viçosa: UFV, 2001.

FERREIRA, C. L. L. **Prebióticos e Probióticos**: Atualização e Prospecção. Editora Rubio, 2012.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 719-732, 2017.

MALDONADE, I. R; CARVALHO, P. G. B; FERREIRA, N. A; MOULIN, B. S. F. **Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson**. Embrapa, 2013.

YOVANOUDI, M.; DIMITRELI, G.; RAPHAELIDES, S. N.; ANTONIOU, K. D. Flow behavior studies of kefir type systems. **Journal of Food Engineering**, v. 118, n. 1, p. 41-48, 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F.A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, cap. 14, p.183-189, 2007.

ZONGO, O. et al. Physicochemical composition and fermentation kinetics of a novel Palm Sap-based Kefir Beverage from the fermentation of *Borassus aethiopum* Mart. fresh sap with kefir grains and ferments. **Scientific African**, v. 10, p. e00631, 2020.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo financiero brindado por la Cooperación CAPES/FAPES a través del Programa de Desarrollo de Posgrado – Proceso PDPG número 2021-5S41N y también al CNPq por la beca de productividad en desarrollo tecnológico otorgada al investigador prof. Dr. Luciano J. Q. Teixeira. Finalmente, agradecemos a FAPES por la beca de maestría de la autora Samarha P. Wichelo.