



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**Tecnología y propiedades de los productos lácteos fermentados
con cultivos del kéfir**

**Technology and properties of milk products fermented with
kefir cultures**

Autora:

Emma Pinilla Carrera

Directora:

M^a Lourdes Sánchez
Paniagua

Facultad de Veterinaria

2021-2022

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. El kéfir	4
2.2. Origen e historia del kéfir.....	4
2.3. Microorganismos utilizados como cultivo.....	5
2.3.1. Gránulos del kéfir	5
2.3.2. Bacterias presentes en el kéfir	6
2.3.3. Levaduras y mohos presentes en el kéfir	7
2.3.4. Interacciones entre los microorganismos del kéfir.....	8
2.4. Tipos de kéfir y su elaboración	8
2.4.1. Kéfir de leche.....	8
2.4.2. Kéfir de agua.....	9
2.4.3. Kéfir de té	9
2.5. Propiedades del kéfir	10
2.5.1. Antimicrobiana	10
2.5.2. Sistema inmune.....	11
2.5.3. Antihipertensiva	12
2.5.4. Anticancerígena.....	12
2.5.5. Antioxidante	12
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	17
4. METODOLOGÍA.....	19
4.1. Metodología bibliográfica	19
4.2. Metodología experimental	19
4.2.1. Elaboración del kéfir.....	19
4.2.2. Determinación de pH	22
4.2.3. Determinación de la acidez titulable.....	22
4.2.4. Determinación del contenido en proteína.....	22
4.2.5. Determinación de la actividad antioxidante	23
4.2.6. Electroforesis con SDS (SDS-PAGE)	25
4.2.7. Fraccionamiento de los sobrenadantes del kéfir	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
5.1. Determinación del pH y acidez titulable.....	27
5.2. Determinación del contenido en proteína.....	29

5.3.	Determinación de la capacidad antioxidante	30
5.4.	Actividad antioxidante de la fracción microbiana del kéfir	34
5.5.	Actividad antioxidante de las muestras fraccionadas.....	35
5.6.	Análisis de la composición proteica de las fracciones del kéfir por SDS-PAGE	36
6.	CONCLUSIONES.....	38
7.	VALORACIÓN PERSONAL.....	39
8.	BIBLIOGRAFÍA	40

1. RESUMEN/ABSTRACT

La sociedad actual tiene una visión negativa hacia los microorganismos, la percepción ante ellos suele estar asociada con el desarrollo de enfermedades y alteración de los alimentos. Aunque estos hechos sean indiscutibles, también pueden llegar a ser agentes beneficiosos y proporcionarnos un refuerzo para mantener una buena salud. Este es el caso de los microorganismos probióticos presentes en algunos de los alimentos que consumimos habitualmente. En concreto, este estudio se ha centrado en el kéfir como probiótico, producto formado por levaduras y bacterias con numerosas bioactividades. Algunas de ellas de gran importancia como la antioxidante, anticancerígena, antihipertensiva, antimicrobiana e incluso sobre el sistema inmune. El objetivo de este trabajo ha sido recopilar información sobre las propiedades que presenta el kéfir, y realizar ensayos para determinar su actividad antioxidante. Esta se ha evaluado con el método DPPH a partir del kéfir elaborado con sustratos como leche cruda, leche pasteurizada y lactosuero, un subproducto derivado de la industria quesera, cuya utilización para este tipo de producto fermentado permitiría revalorizarlo. Hemos podido concluir que el kéfir tiene una actividad antioxidante elevada y que esta varía de forma oscilante a lo largo del almacenamiento en refrigeración, y depende del cultivo iniciador y el contenido de proteína del sustrato, e incluso del tratamiento térmico utilizado para tratarlo. Por lo tanto, con los resultados obtenidos se puede afirmar que el kéfir posee propiedades que pueden reportar un beneficio para la salud.

Today's society has a negative view towards microorganisms; the perception of them is usually associated with the development of diseases and alteration of food. Although these facts are unquestionable, they can become beneficial agents and provide us with a reinforcement to maintain good health. This is the case of the probiotic microorganisms present in some of the foods we usually consume. Specifically, this study has focused on kefir as a probiotic, a product formed by yeasts and bacteria with numerous bioactivities. Some of them are very important, such as antioxidant, anticancer, antihypertensive, antimicrobial and even on the immune system. The objective of this work has been to collect information on the properties of kefir and carry out tests to determine its antioxidant activity. This has been evaluated with DPPH method on kefir made with substrates such as raw milk, pasteurized milk and whey, a product derived from cheese industry, whose use for this type of fermented product would allow it to be revalued. We have been able to conclude that the kefir has a high antioxidant activity that varies in an oscillating way along cold storage, and depends on the starter used and the protein of the substrate, and even the heat treatment applied to it. Therefore, with the results obtained it can be affirmed that kefir has beneficial properties for health.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El kéfir

El kéfir es un producto con leve grado alcohólico (0,2-0,6%) (*Spreer y Torres-Quevedo, 1991*) elaborado a partir de leche que sufre un proceso de fermentación mixta, es decir, tanto láctica como alcohólica. En unas condiciones determinadas, el uso de bacterias y levaduras como microorganismos iniciadores o estárter, confiere al kéfir las características óptimas para tener propiedades saludables y beneficiosas.

El kéfir se caracteriza principalmente por tener un color blanquecino y un sabor ácido, derivado del ácido láctico que es producido en la fermentación como consecuencia de la degradación de la lactosa.

Los granos del kéfir, que forman el agente fermentador, son partículas de aspecto gelatinoso que pueden variar de tamaño, en las que se localizan las bacterias y levaduras en una matriz de polisacáridos y proteínas. Este polisacárido ramificado se denomina kefirán, producido por la interacción de diversos microorganismos que producen metabolitos para favorecer el crecimiento mutuo (*Martin, 2018*).

2.2. Origen e historia del kéfir

En cuanto a su origen, varias fuentes bibliográficas establecen que el kéfir se lleva consumiendo desde hace miles de años, siendo una de las leches fermentadas más antiguas. Hay evidencias de que este producto proviene de las montañas del Cáucaso, considerándose allí un alimento básico de la dieta (*Tamime, 2008*).

Los musulmanes también lo denominaban “granos del profeta Mahoma” ya que fue él quien lo introdujo en su pueblo y consideraban a los gránulos del kéfir como un regalo de Alá (*Epstein & Velazco, 2020*), creían que si lo consumían personas de otras religiones perdería su poder fermentativo, por ello su elaboración se mantuvo en secreto durante mucho tiempo.

La palabra kéfir proviene de “keif” que en turco significa “sensación agradable” esto deriva del bienestar experimentado al ingerir este producto (*Trum, 2004*).

Aunque actualmente el kéfir se elabora principalmente con leche de vaca, en el pasado no era así, pues predominaban la de oveja, búfala, yegua y cabra (*Tamime, 2008*). No se sabe con seguridad como pudo originarse, una explicación posible sería el uso de prácticas realizadas por las tribus del Cáucaso a partir de leche cruda y el cuajo del ternero, aunque se opta por la opción de que deriva de una bebida llamada “ayrag”, esta se producía dejando la leche en

recipientes elaborados con piel de cabra que no se lavaban ni limpiaban y se iba añadiendo más leche cuando se consumía debido a la fermentación, así pues observaron que se formaba una costra derivando de ahí otro tipo de bebida a la que denominaron kéfir (*Yanos et al., 2017*).

El kéfir no se conocía fuera del Cáucaso, Marco Polo lo mencionaba en los libros de sus viajes a Oriente, pero en Occidente no se le daba importancia a este producto. Fue así durante cinco siglos hasta que en el XIX, con el incremento de la tuberculosis, se empezó a utilizar con un fin terapéutico para combatir esta enfermedad (*Trum, 2004*). Además, el kéfir se empezó a relacionar con la longevidad de los pueblos que lo consumían y se acabó popularizando en Europa.

El kéfir empezó a expandirse por otros lugares, llegando primero a Moscú en torno al siglo XX. Rusia sigue siendo el país donde más se consume este producto. En cuanto a España, la entrada se produjo a través de las Islas Baleares a mediados del siglo XX, y posteriormente, se comenzó a comercializar. Aun así no tuvo mucho éxito pues se desconocía el producto debido a que no estaba adaptado a nuestra cultura (*Fernández, 2017*).

Actualmente, el kéfir se consume cada vez más por todo el mundo, incluyendo países como Estados Unidos y Japón, esto va asociado a la demostración de sus propiedades terapéuticas y nutricionales (*Salazar et al., 2019*).

2.3. Microorganismos utilizados como cultivo

2.3.1. Gránulos del kéfir

Los gránulos del kéfir están compuestos principalmente por una mezcla de células microbianas, sus metabolitos, proteínas de leche coaguladas y carbohidratos (*Tamime, 2008*) Además, los gránulos son la fracción que posee la diversidad microbiológica predominante, existiendo gran variedad de especies de bacterias acéticas, lácticas y levaduras, que se encuentran en un estado de simbiosis (*Martin, 2018*).

Estos microorganismos destacan por su estabilidad en el medio, ya que son capaces de mantener su actividad a lo largo de los años si se conservan bajo condiciones adecuadas (*Tamime, 2008*), e igualmente por proporcionar metabolitos bioactivos que favorecerán el crecimiento del gránulo y protegerán contra posibles contaminantes y microorganismos patógenos (*Martin, 2018*).

Asimismo, la microbiota del kéfir se encuentra inmovilizada en una matriz de polisacáridos y proteínas, siendo el polisacárido predominante el kefirán; este es un heteropolisacárido soluble en agua que posee proporciones iguales de glucosa y galactosa, y es producido fundamentalmente por *Lactobacillus kefiranofaciens*. Destacamos además, que el kefirán es el elemento que proporciona la mayoría de las propiedades organolépticas al kéfir (Sebastián y Sánchez, 2020).

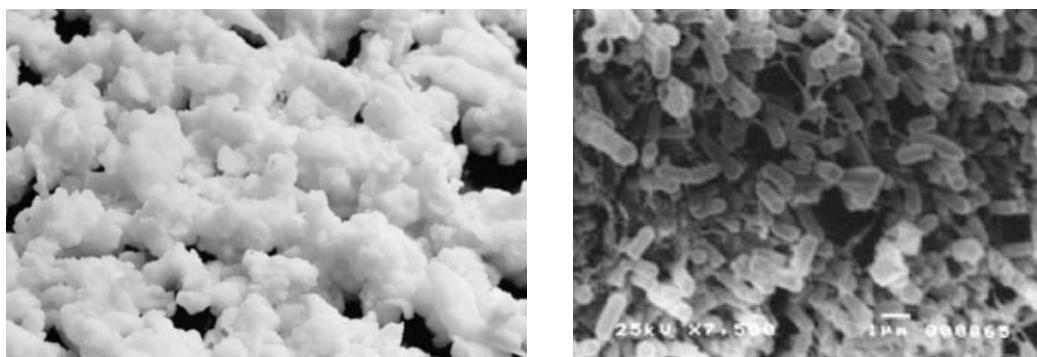


Ilustración 1: Fotografías de la estructura típica de los gránulos de kéfir (izquierda) y en microscopía electrónica de barrido (derecha) (Tamime, 2008).

2.3.2. Bacterias presentes en el kéfir

La composición microbiológica del kéfir es muy compleja y consiste en un 83-90% de bacterias ácido lácticas, 10-17% de levaduras y el resto bacterias acido acéticas y mohos, destacando la presencia de Lactobacilos que es mayor y la de Bifidobacterias que es menor (Salazar et al., 2019).

En cuanto a las bacterias presentes en el kéfir, los géneros predominantes son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*, siendo las bacterias ácido lácticas las responsables de la producción de ácido láctico a partir de lactosa y de provocar el descenso del pH, también se pueden producir otros compuestos en menor medida como el diacetilo, acetaldehído, etilo y algunos aminoácidos (Martin, 2018).

Los compuestos aromáticos del kéfir como el diacetilo están producidos principalmente por bacterias como *Streptococcus diacetylactis* y *Leuconostoc*.

- Las bacterias ácido lácticas presentes en el kéfir las podemos clasificar en varios grupos según su género: (Tamime, 2008)
 - *Lactobacillus*: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens* subsp. *Kefirgranum*, *L. acidophilus*, *Lentilactobacillus kefiri* (*Lactobacillus kefiri*), *Limosilactobacillus fermentum* (*Lactobacillus fermentum*)

- Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*), *Lacticaseibacillus casei* (*Lactobacillus casei*), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (*Lactobacillus rhamnosus*), *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lactobacillus paracasei*), *L. sakei*.
- *Lactococcus*: *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*.
 - *Streptococcus*: *S. thermophilus*.
 - Cepas positivas de citrato: *L. lactis* subsp. *diacetylactis*
 - *Leuconostoc*: *L. cremoris* y *L. mesenteroides*.
 - *Enterococcus*: *E. durans*.
 - En cuanto a las Bifidobacterias destacan: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium longun*, *Bifidobacterium pseudolongun*.
 - Las bacterias acido acéticas predominantes son: *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter rasens*, *Acetobacter orientalis*, *Acetobacter syzygii*, *Gluconobacter japonicus* y *G. frateurii*.

2.3.3. Levaduras y mohos presentes en el kéfir

En cuanto a las levaduras, que son las responsables de la producción de etanol y CO₂ en la fermentación, se consideran las principales promotoras de las propiedades sensoriales del kéfir (Martin, 2018).

Las especies predominantes de levaduras son (Tamime, 2008):

- *Kluyveromyces*: *K. marxianus*, *K. lactis*, *K. siamensis*.
- *Candida*: *C. kefir*, *C. colliculosa*, *C. holmii*, *C. maris*, *C. inconspicua*, *C. pseudotropicalis*, *C. tenuis* y *C. valida*.
- *Mycotorula*: *M. lactis* y *M. lactosa*.
- *Saccharomyces*: *S. cerevisiae*, *S. turicensis*, *S. dairensis*, *S. exinguus*, *S. unisporus*.
- Otras: *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora*, *Issatchenkovia orientalis*, *Debaryomyces occidentalis*, *Brettanomyces anomalus* y *Zygosaccharomyces florentinus*.
- Mohos: *Geotrichum candidum*, existe controversia con este microrganismo ya que se considera contaminante, aunque formando parte de la microbiota del kéfir no afecta a la calidad del producto final.

Destacamos que las más comunes en el kéfir son *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefyr* y *Kluyveromyces marxianus* (Juzdado, 2018).

2.3.4. Interacciones entre los microorganismos del kéfir

Según el origen de los gránulos, la composición microbiológica del kéfir mostrará variaciones, aunque siempre predominaran las bacterias lácticas (*Sebastián y Sánchez, 2020*).

Toda la microbiota se encuentra en un estado de simbiosis para favorecer el crecimiento y la supervivencia mutua, tanto de bacterias como de levaduras, además se ha verificado que al aislarlas hay una notable reducción de su actividad (*Martin, 2018*).

En cuanto a las bacterias del género *Lactobacillus*, tienen gran velocidad de crecimiento y al hidrolizar la lactosa generan el ambiente idóneo para el crecimiento de las levaduras (*Tamime, 2008*).

Las levaduras son capaces de asimilar el ácido láctico producido por las bacterias ácido lácticas, elevando el pH y generando nutrientes esenciales como aminoácidos y vitaminas, estimulando así el crecimiento de las bacterias (*Arslan, 2015*).

Las levaduras también poseen actividad proteolítica, permitiendo la producción de péptidos a partir de las proteínas lácteas, que aumentan la biodisponibilidad del nitrógeno que necesitan las bacterias como fuente de energía (*Rodríguez et al., 2017*).

Por último, destacar que las bacterias del género *Acetobacter* producen vitamina B, favoreciendo el crecimiento de los demás microorganismos presentes en los granos de kéfir (*Tamime, 2008*).

2.4. Tipos de kéfir y su elaboración

2.4.1. Kéfir de leche

Este tipo de kéfir es el más conocido, ya que tiene características parecidas al yogur, es de color blanco y además se puede consumir como bebida fermentada tras una filtración de los granos.

Se elabora con leche fresca, normalmente de vaca aunque como he mencionado anteriormente, en el pasado se elaboraba con leche de otras especies como la de oveja, camella o de yegua. La leche que se utiliza para la elaboración de kéfir suele estar pasteurizada, sin tratamientos térmicos muy intensos como la esterilización o UHT para evitar la pérdida de sus características organolépticas y nutritivas (*Fernández, 2017*). Para su

elaboración existen dos tipos de métodos diferentes: el método tradicional y el método industrial.

En cuanto al método tradicional, los granos de kéfir se añaden a la leche pasteurizada mientras que en el método industrial se agregan directamente los cultivos aislados en la leche, que previamente ha sido homogeneizada, en ambos casos la leche se fermenta posteriormente a 25°C durante 20-24 h hasta que el pH alcanza 4,6. Finalmente, se filtra para separar la leche de los granos del kéfir y se almacena a 4°C. En el método tradicional los granos del kéfir se guardan para reutilizarlos en la siguiente elaboración (*Guzel-Seydim et al., 2021*).

2.4.2. Kéfir de agua

En cuanto al kéfir de agua, originario de la región de México, destaca que su obtención se realiza a partir de una solución con sacarosa para conseguir la doble fermentación, al igual que en el de leche, y para obtener así un producto final con un ligero sabor ácido (*Juzdado, 2018*).

Físicamente, el kéfir de leche y el de agua se diferencian en el aspecto de los gránulos, ya que en el kéfir de agua, además de ser más consistentes y pequeños, son transparentes, más sueltos y de un tono marrón (*Fernández, 2017*). Hay que destacar que ambos tipos de kéfir poseen la misma microbiota solo que la adaptación al medio es diferente, esta adaptación provoca la pérdida de algunos microorganismos que estaban presentes en el kéfir de leche como el *Lactobacillus kefiranofaciens*. Aun así también aparecen otros nuevos como el *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*) que produce un polisacárido soluble en agua (*Fernández, 2017*).

El proceso de elaboración comienza con la mezcla del agua y del azúcar, tras una posterior pasteurización se añaden los granos del kéfir de agua y se fermenta durante 20-25 h a 25°C, los granos del kéfir de agua se separan para volverlos a utilizar después y se almacenan a 4°C (*Guzel-Seydim et al., 2021*).

2.4.3. Kéfir de té

El kéfir de té, también denominado kombucha es el que presenta más diferencias con los dos anteriores. Para empezar, los microrganismos responsables de la fermentación son bacterias acéticas como *Acetobacter xylinum* y levaduras como *Zygosaccharomyces rouxii* y *Candida spp* (*Fernández, 2017*).

El proceso de elaboración es más lento (15-30 días) y se realiza en aerobiosis para proporcionarle características sensoriales propias, aunque sufriendo un mayor riesgo de

contaminación. Se elabora a partir té azucarado, normalmente frío para evitar la muerte de los microorganismos. Además se crea en el producto una capa superficial que va ganando grosor a lo largo de los días por el crecimiento continuo de los microorganismos (*Fernández, 2017*).

Dependiendo del tiempo de fermentación y del tipo de té (negro, verde o rojo) tendrá unas características sensoriales u otras ya que se va perdiendo el sabor dulce con el desarrollo de la fermentación (*Juzdado, 2018*).

2.5. Propiedades del kéfir

Como ya se ha mencionado anteriormente, el kéfir se utilizaba en el pasado por sus buenos resultados contra la tuberculosis y otras enfermedades como cánceres y gastroenteritis, según estudios como los de Otles y Cagindi (2003) y Kocak y Gursel (1981) (*Tamime, 2008*).

El kéfir es un producto que se caracteriza por sus cualidades tanto nutricionales como saludables y se han realizado numerosos estudios para verificar y evaluar sus características.

Estas características se deben a que posee dos tipos de componentes: una fracción bacteriana que es la responsable de sus propiedades como probiótico y una fracción no bacteriana responsable de la actividad antimicrobiana, compuesta sobre todo por los metabolitos producidos por los microrganismos como ácidos orgánicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, exopolisacáridos y bacteriocinas (*Yilmaz-Ersan et al., 2018*). Estos componentes actuarán en conjunto o independientemente para producir los efectos saludables (*Machado de Oliveira et al., 2013*).

Debido a los péptidos bioactivos que contiene el kéfir, derivados del proceso de fermentación, se le atribuyen otras importantes propiedades como la antihipertensiva, sistema inmune, antioxidante y antimicrobiano (*Yilmaz-Ersan et al., 2016*).

2.5.1. Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana del kéfir es debida a la producción de metabolitos por parte de los microorganismos. Además, provoca un aumento de la acidez del medio así como la disminución del potencial redox y del contenido disponible de nutrientes, lo que afecta al crecimiento y a la supervivencia de los agentes patógenos (*Rodríguez et al., 2017*).

Los metabolitos que producen los fermentos del kéfir se caracterizan por poseer un efecto bacteriostático sobre las bacterias Gram negativas, mientras que son más efectivos contra las bacterias Gram positivas afectando notablemente a su supervivencia, como por ejemplo sobre

Salmonella thypi y *Escherichia coli* (Azizi et al., 2021). Además, se ha observado que los exopolisacáridos que producen tienen efecto bactericida sobre *Salmonella enteriditis* y *Listeria monocytogenes* (Jeong et al., 2017).

La cepa de *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lactobacillus paracasei*), se ha identificado como la principal productora de la bacteriocina F1 de elevada actividad antimicrobiana sobre las Gram positivas, negativas e incluso hongos como *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans* y *Penicillium glaucum* (Rodríguez et al., 2017).

Esta propiedad antimicrobiana también favorece la salud gastrointestinal, un ejemplo es el caso de *Lactobacillus acidophilus* que posee una proteína en la capa superficial que puede reducir la apoptosis inducida por patógenos intestinales mediante la regulación de la vía apoptótica mitocondrial (Azizi et al., 2021). Incluso con la combinación de las actividades de varios microrganismos del kéfir se ha estudiado la protección que realizan cuando hay una infección con *Clostridium difficile* que es el principal responsable de procesos graves de diarrea y enterocolitis (Rea et al., 2007).

En relación con el efecto sobre los patógenos intestinales, cabe mencionar que la fracción no bacteriana compuesta por ácidos orgánicos como el ácido láctico procedente de la etapa de fermentación también ha demostrado tener capacidad para inhibir el crecimiento y adhesión de patógenos sobre las células epiteliales del intestino (Iraporda et al., 2017).

Además ya hay algunos estudios sobre el potencial del kéfir como antiviral, como en el caso del COVID u otras infecciones virales como el Zika, hepatitis C o los rotavirus (Azizi et al., 2021).

2.5.2. Sistema inmune

Su carácter como probiótico también ayuda a la regulación del sistema inmune dificultando la acción de los microorganismos patógenos y regulando el desarrollo de enfermedades.

Una de las causas es la utilización de leche como sustrato, ya que esta contiene oligosacáridos, importantes en la modulación del sistema inmune. También es debido a ciertas cepas presentes en los granos del kéfir que son capaces de estimular el sistema inmune (Rodriguez et al., 2017).

Además se ha demostrado la capacidad inmunomoduladora de las bacterias lácticas aisladas de los granos del kéfir observándose un aumento de los niveles totales de inmunoglobulina A tras su consumo (Rodriguez et al., 2017).

2.5.3. Antihipertensiva

La capacidad del kéfir para regular la presión arterial se debe principalmente a la producción de péptidos bioactivos que son liberados por los sistemas enzimáticos derivados de la actividad proteolítica de los microorganismos sobre las proteínas de la leche (*Rodríguez et al., 2017*).

Hay que destacar los péptidos que ejercen la actividad inhibitoria sobre la enzima convertidora de angiotensina, ya que está involucrada en las reacciones metabólicas que incrementan la presión arterial y su inhibición es responsable de esta propiedad terapéutica que se ha propuesto para el kéfir para aliviar este problema (*Amorim et al., 2019*).

La producción de exopolisacáridos solubles en agua también se ha relacionado con una disminución de la hipertensión ya que poseen el mismo mecanismo de inhibición competitiva que los péptidos (*Rodríguez et al., 2017*).

2.5.4. Anticancerígena

Las células cancerígenas se caracterizan por su elevada proliferación y su resistencia a la apoptosis, de hecho las células tumorales poseen la capacidad de evadir la respuesta inmune. Por ello, se han realizado numerosas investigaciones sobre el consumo de alimentos probióticos, ya que como se ha mencionado, las bacterias probióticas pueden estimular las funciones del sistema inmune (*Sharifi et al., 2017*) o incluso ser responsables del retraso de las actividades enzimáticas que convierten compuestos procarcinógenos en carcinógenos (*Machado de Oliveira et al., 2013*).

En concreto, el kéfir promueve la resistencia de la mucosa intestinal frente a infecciones, puede interactuar con varias vías celulares y regular procesos biológicos como la apoptosis, reducir los procesos de oxidación, el daño al DNA y la proliferación de las células tumorales (*Sharifi et al., 2017*).

También se observó la producción de un factor de necrosis tumoral por parte de células inducidas tanto por leche fermentada con *Lactobacillus kefiranofaciens*, como por el sobrenadante del kéfir (*Rodriguez et al., 2017*).

2.5.5. Antioxidante

Los antioxidantes son sustancias químicas capaces de neutralizar y secuestrar los radicales libres que se producen continuamente en el cuerpo, estos se pueden incorporar por la dieta

para ayudar a minimizar el daño causado por los radicales libres y reducir el estrés oxidativo que contribuye al daño celular y deriva en agravar algunas enfermedades crónicas como la diabetes, la arterioesclerosis o los problemas cardiovasculares (*Khan et al., 2019*).

Las proteínas de origen lácteo han demostrado poseer fracciones peptídicas que son capaces de disminuir el estrés oxidativo, también se ha demostrado este efecto con el kéfir, debido a que su microbiota libera péptidos con propiedades antioxidantes (*Rodríguez et al., 2017*).

Esta propiedad antioxidante se debe a que las bacterias lácticas son capaces de producir exopolisacáridos con potencial antioxidante. Además, algunos granos concretos de kéfir producen exopolisacáridos, que pueden minimizar la presencia de radicales hidroxilo, superóxido y peróxido (*Rodríguez et al., 2017*), e incluso pueden inhibir la autooxidación del ascorbato, así como potenciar el poder quelante sobre el hierro (*Yilmaz-Ersan et al., 2016*).

El hierro puede actuar como catalizador en numerosas reacciones oxidativas y, por lo tanto, aumentar la probabilidad de aparición de algunas enfermedades como el cáncer. Algunas fracciones lácteas tienen un mayor número de grupos de fosfoserilserina que tiene gran afinidad por el hierro, además el grupo carboxilo de los aminoácidos asparagina y glutamina también puede unir hierro y evitar que participe en reacciones oxidativas (*Liu et al., 2005*).

Asimismo, se ha determinado que también hay una gran influencia de enzimas antioxidantes intracelulares como la superóxido dismutasa (SOD), la GSHP (glutatióperoxidasa) y la catalasa, estas están presentes en la leche debido a que algunas bacterias del ácido láctico son capaces de expresar esa actividad SOD, la actividad de esta enzima recae principalmente en catalizar la reacción para la eliminación de superóxidos (*Liu et al., 2005*).

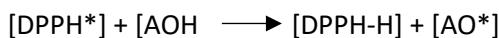
Además la acción antioxidante del kéfir se incrementa por la presencia de macromoléculas en el sustrato como las proteínas lácteas anteriormente mencionadas o los compuestos fenólicos, presentes sobre todo en el kéfir de té (*Vázquez y Koch, 2021*).

2.5.5.1 Métodos para determinar la capacidad antioxidante

Hay diversos métodos químicos que se aplican a ensayos *in vitro* para la determinación de la actividad antioxidante, estos métodos pueden ser de transferencia de electrones, de átomos de hidrógeno o pueden ser mixtos. Aunque los más comunes son el DPPH y el ABTS, a continuación se van a explicar algunos de los más importantes describiendo sus ventajas e inconvenientes.

DPPH

El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) es un radical libre estable, ya que no se dimeriza, como sucede con la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón en la molécula DPPH determina la aparición de un color púrpura, con una banda de absorción que tiene un máximo en 520 nm (*Pisoschi y Negulescu, 2011*). Cuando el DPPH reacciona con una molécula donante de hidrógeno (el agente antioxidante, AOH), se genera la forma reducida pasando de DPPH* a DPPH₂ y desaparece el color violeta dando lugar a tonalidades amarillas (*Guja-Poma et al., 2015*). Por lo tanto, la disminución de la absorbancia depende linealmente de la concentración del compuesto antioxidante, siendo la siguiente reacción la que tiene lugar:



Para la realización de los ensayos se suele utilizar un análogo de la vitamina E denominado Trolox, este se utiliza como antioxidante estándar a diferentes concentraciones para su calibración (*Pisoschi y Negulescu, 2011*).

Este método colorimétrico es ampliamente utilizado debido a su simplicidad, rapidez, sensibilidad y reproducibilidad (*Yilmaz-Ersan et al., 2016*).

FRAP

El método FRAP (ferric reduction ability of plasma) que significa poder antioxidante reductor férrico es un ensayo que se basa en la reducción por los antioxidantes del complejo ion férrico TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)- 1,3,5-triazina) a la forma ferrosa a bajo pH. La unión de Fe²⁺ da lugar a un color azul marino intenso que se puede medir con el espectrofotómetro a 593 nm (*Yilmaz-Ersan et al., 2018*).

La absorbancia se puede medir para evaluar la cantidad de hierro reducida y se puede relacionar con la cantidad de antioxidante. Se suelen utilizar como referencias Trolox o ácido ascórbico (*Pisoschi y Negulescu, 2011*).

Aunque este es un método simple, reproducible y barato no se puede determinar con él la capacidad antioxidante de todos los antioxidantes, como por ejemplo el glutatión (*Pisoschi y Negulescu, 2011*).

ABTS

El radical catiónico del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenztiazolina-6-sulfónico) se forma por la pérdida de un electrón del átomo de nitrógeno del ABTS, este absorbe a 743 nm dando lugar

a un color verde azulado. En presencia de Trolox o de otro antioxidante capaz de donar hidrógeno, se neutralizan los radicales catiónicos y se produce la decoloración (*Pisoschi y Negulescu, 2011*).

Para la realización del ensayo hay que preparar una solución del compuesto ABTS, este tiene que ser oxidado por persulfato de potasio o dióxido de manganeso para dar lugar al radical catiónico ABTS, almacenándolo en oscuridad antes de su uso. Tras el procedimiento del ensayo y su reposo se puede medir la absorbancia en el espectrofotómetro (*Yilmaz-Ersan et al., 2018*).

ORAC

El ensayo ORAC (oxygen radical absorbance capacity) que significa capacidad de absorción de radicales de oxígeno. Este es un método fluorimétrico que mide la actividad de los compuestos antioxidantes para eliminar el radical peroxilo, generado por el AAPH (diclorhidrato de 2,2'-azobis-2-amidino-propano) a 37 °C. Se utiliza fluoresceína como sensor fluorescente ya que el radical lo oxidará e irá perdiendo su fluorescencia lo que permitirá registrarla de manera continua y como patrón se puede utilizar Trolox. Aunque este es un método de alta especificidad requiere 60 min más que en el método FRAP para poder cuantificar los resultados (*Pisoschi y Negulescu, 2011*).

TRAP

El método TRAP (total radical trapping power) que significa poder de captación de radicales totales, utiliza la quimioluminiscencia con luminol, al igual que en el método ORAC se utiliza AAPH para generar radicales peroxilos pero en este caso se mide el oxígeno consumido durante la reacción. La señal de la quimioluminiscencia deriva de la producción de radicales de luminol por la descomposición térmica del AAPH. El valor de TRAP se determina a partir de la duración del período de tiempo durante el cual la muestra apaga la señal de quimioluminiscencia por la presencia de antioxidantes y se compara con una muestra de Trolox como referencia (*Pisoschi y Negulescu, 2011*).

HORAC

El método HORAC (hydroxyl radical antioxidant capacity) que significa capacidad antioxidante de radicales hidroxilo, es una técnica que se basa en medir la actividad quelante de los antioxidantes, esto se realiza con la mezcla de Fenton (para la formación de radicales hidroxilos). El método utiliza un complejo Co (II) y evalúa la capacidad de protección contra la formación del radical hidroxilo. Al igual que el método ORAC utiliza fluoresceína como sensor fluorescente ya que esta se oxida con los radicales hidroxilo que son producidos por la mezcla

de fenton, la fluoresceína se incuba con la muestra y se realiza su medida inicial, luego se van tomando lecturas cada minuto ya que el reactivo de fenton apaga la fluoresceína con el tiempo. Los antioxidantes presentes bloquearán la oxidación del radical hidroxilo hasta que se agote la capacidad antioxidante de la muestra Para la realización de la curva estándar se puede utilizar ácido gálico (*Pisoschi y Negulescu, 2011*).

Este ensayo proporciona una medición directa de la capacidad antioxidante relacionada con los radicales hidroxilo al interrumpir esa reacción del radical (*Munteanu y Apetrei, 2021*).

CUPRAC

El método CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) significa capacidad antioxidante sobre el cobre. En este ensayo los antioxidantes se mezclan con CuSO₄ y neocuproina, tras 30 min se mide la absorbancia a 450 nm ya que el cobre (II) se reduce a cobre (I) por la acción de los antioxidantes que donan electrones. Los resultados de este método se pueden expresar usando Trolox como referencia (*Pisoschi y Negulescu, 2011*).

Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos se pueden utilizar para la detección y la separación de los diferentes antioxidantes, algunos comúnmente medidos son la vitamina E o los β carotenos. Aunque estas técnicas son útiles para la determinación de algunos antioxidantes más específicos, también destacan por ser más complejas además de ser más costosas económicamente (*Yilmaz-Ersan et al., 2018*).

- Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es un tipo de cromatografía utilizada para separar y analizar compuestos que se pueden vaporizar sin descomponerse. El proceso se lleva a cabo comparando los tiempos de retención entre una fase estacionaria líquida y una fase móvil de gas inerte como el helio o el nitrógeno, siendo la fase estacionaria una capa de líquido microscópica. Los detectores que más se utilizan para la medida de la actividad antioxidante son el detector de ionización de llama y el detector de conductividad térmica (*Pisoschi y Negulescu, 2011*).

- HPLC

La cromatografía líquida de alto rendimiento utiliza diferentes tipos de fases estacionarias, una o más fases móviles y el analito circula a través de la columna. El detector puede proporcionar información adicional del analito como los datos espectroscópicos en el espectro UV/visible. La

detección de compuestos con actividad antioxidante mediante HPLC se puede acoplar al método del ABTS, ya que tras la separación de la muestra en la columna, se realiza una mezcla con el ABTS y mediante un detector que mide absorbancia a 720 nm se determina la pérdida de color que da lugar a un pico negativo en el HPLC. (*Pisoschi y Negulescu, 2011*).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El interés por el tema de este trabajo recae en la creciente importancia de las leches fermentadas, su interés como alimento probiótico y sus propiedades terapéuticas, como ha quedado reflejado en la revisión bibliográfica.

Este tipo de derivado lácteo ha sufrido un increíble incremento de consumo en los últimos años, debido a que el consumidor actual busca productos beneficiosos para su salud. Además según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA), el consumo de estos productos se incrementa más de un 4% cada año en España, destacando que se produjo un notable incremento en los meses de la pandemia.

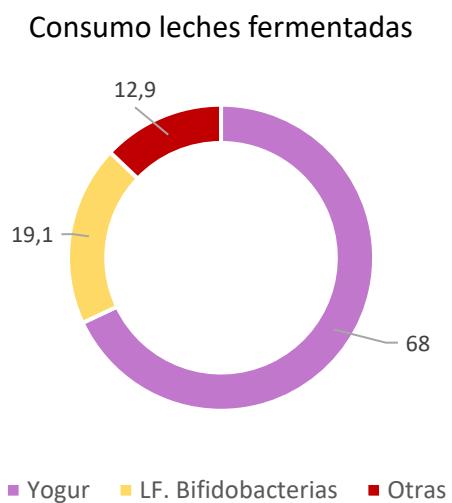
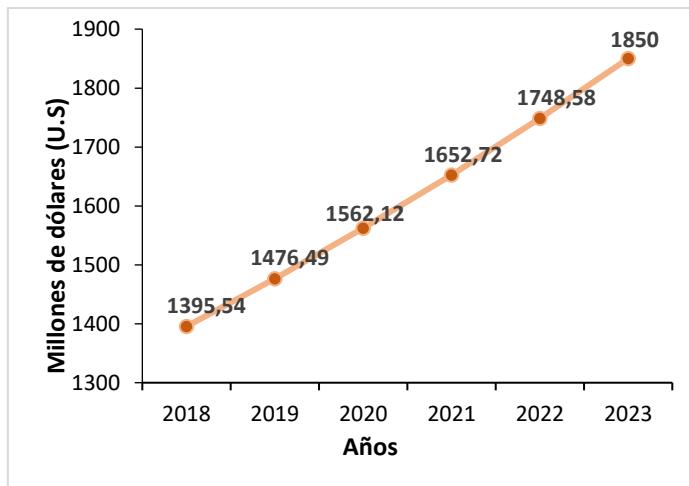


Figura 1: Consumo de leches fermentadas en 2019, por % volumen. MAPAMA.

Podemos observar que el yogur sigue siendo el producto más consumido, pero el porcentaje de otros tipos de leches fermentadas es una fracción que cada vez adquiere mayor importancia.



Gráfica 1: Mercado mundial del kéfir desde 2018 y expectativas en 2023 (Statista).

En esta gráfica se representan los datos de mercado referentes al kéfir en todo el mundo en los últimos años, incluyendo además una predicción para el año 2023. Identificamos claramente una tendencia ascendente de la producción de kéfir con los años.

Además de la importancia del consumo del kéfir este producto y sus propiedades terapéuticas, otra razón para la elaboración de este trabajo ha sido la del reaprovechamiento de recursos, evaluando la posibilidad de utilizar el lactosuero para la elaboración del kéfir. El lactosuero es un subproducto de la industria quesera que puede llegar a convertirse en un problema medioambiental. Evaluaremos el potencial antioxidante del kéfir elaborado con lactosuero respecto al kéfir elaborado con leche como sustrato.

El principal objetivo de este trabajo ha sido el análisis de las propiedades del kéfir, ya sean biológicas y tecnológicas, incidiendo sobre todo en su capacidad antioxidante. Para ello se establecieron una serie de objetivos parciales:

- Evaluar las diferencias en la capacidad antioxidante del kéfir según el tipo de sustrato utilizado para su elaboración.
- Determinar la variabilidad en la capacidad antioxidante del kéfir con la utilización de distintos cultivos iniciadores.
- Analizar la influencia del tiempo de almacenamiento del kéfir en refrigeración tras la fermentación en su capacidad antioxidante.

4. METODOLOGÍA

4.1. Metodología bibliográfica

Para la elaboración de este trabajo se ha realizado una búsqueda tanto de manera directa como por búsqueda inversa, se ha investigado en bases de datos científicas como PubMed, Google académico y ScienceDirect. Las palabras clave utilizadas han sido: kefir, kefiran, kefir microorganism, kefir antioxidant, probiotic kefir y kefir properties.

También se han utilizado otros recursos como libros para la información general del trabajo, al igual que revistas científicas.

Asimismo, se ha seguido una serie de criterios de inclusión y exclusión, como la fecha de publicación de los libros y artículos científicos, y en su mayoría solo los posteriores al año 2000, a partir del cual la información disponible sobre los productos fermentados y en concreto el kéfir, sufrió un incremento. También se han priorizado los artículos científicos en inglés sobre los artículos en español para la obtención de la mayor cantidad de información posible.

4.2. Metodología experimental

4.2.1. Elaboración del kéfir

En la recolección de las muestras necesarias para la realización de los ensayos se elaboró kéfir con diferentes sustratos, siendo estos leche pasteurizada, lactosuero y leche cruda, todos ellos de vaca, denominando a los correspondientes productos obtenidos en función del sustrato como KPM, KW y KRM, respectivamente. Los productos de kéfir se elaboraron con dos tipos diferentes de fermentos de los laboratorios Abiasa S.L. (Pontevedra, España) kéfir B y kéfir C, ambos tipos tienen cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* (*Lactobacillus rhamnosus*), *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lactobacillus paracasei*), *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*. Además, el tipo B tiene *Leuconostoc mesenteroides*, mientras que el tipo C contiene una levadura denominada *Kluyveromyces marxianus*.

En la elaboración del kéfir con leche pasteurizada y con lactosuero se utilizó leche entera de la marca “Puleva”, cuya composición nutricional por 100 mL es: 3,6 g de grasa, de las cuales 2,5 g son saturadas, 4,7 g de hidratos de carbono, de los cuales 4,7 g son azúcares, 3 g de proteína, 0,13 g de sal y 120 mg de calcio. Además, se realizó a la leche la prueba de la fosfatasa alcalina

y de la lactoperoxidasa para evaluar su tratamiento de pasteurización. Para la formación de la cuajada se utilizó 3,5 mL de cuajo enzimático (Abiasa) por cada 2,5 L, se adicionó cloruro de calcio (Laboratorios Arroyo, Santander, España) para favorecer la coagulación y se añadieron 0,15 g de fermento de kéfir B o C por cada 2 L de leche.

La mezcla se dejó en un baño termostático a 34°C durante 45 min y al visualizar la formación de la cuajada se cortó con ayuda de liras, de manera tanto vertical como horizontal para favorecer la salida del suero. Tras el corte, la cuajada se filtró con tela de quesería y se obtuvo el lactosuero deseado.

El kéfir de leche cruda (KRM), de leche pasteurizada (KPM) y de lactosuero (KW) se dejaron fermentar, distribuyendo la mezcla con los fermentos en recipientes de vidrio de 200 mL, en una estufa a 25°C durante 22 h, y tras el tiempo de fermentación se colocaron en refrigeración durante 4 semanas, de esas muestras se extrajo un recipiente cada semana para realizar los ensayos.

Para fraccionar el kéfir, las muestras correspondientes a cada semana de almacenamiento en refrigeración a 4°C tras la fermentación se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min a 20°C, y se separaron las células microbianas del sobrenadante, este último se sometió a un proceso de liofilización (Heto Drywinner, Thermo Electron, Whaltham, MA, EE.UU.) aplicando vacío para eliminar el agua y así poder realizar los ensayos posteriores. Las células microbianas se congelaron a -20°C.

Para el análisis de las células microbianas, previamente se realizó la lisis celular mecánica con perlas. Para ello, se pesaron de 0,4-0,7 g del sedimento celular obtenido en la primera centrifugación y se introdujeron en tubos con las perlas (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francia) para agitarlas en un equipo denominado Precellys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francia) y se usó el programa 2 de dos ciclos de 20 segundos a 5000 rpm. Posteriormente, las muestras se centrifugaron en una microcentrifuga a 13.000 x g durante 10 min para eliminar los restos celulares y obtener un extracto con el que se realizaron los ensayos de actividad antioxidante y BCA.

En la Figura 2 se incluye el diagrama de flujo de la elaboración y procesado de los diferentes productos de kéfir.

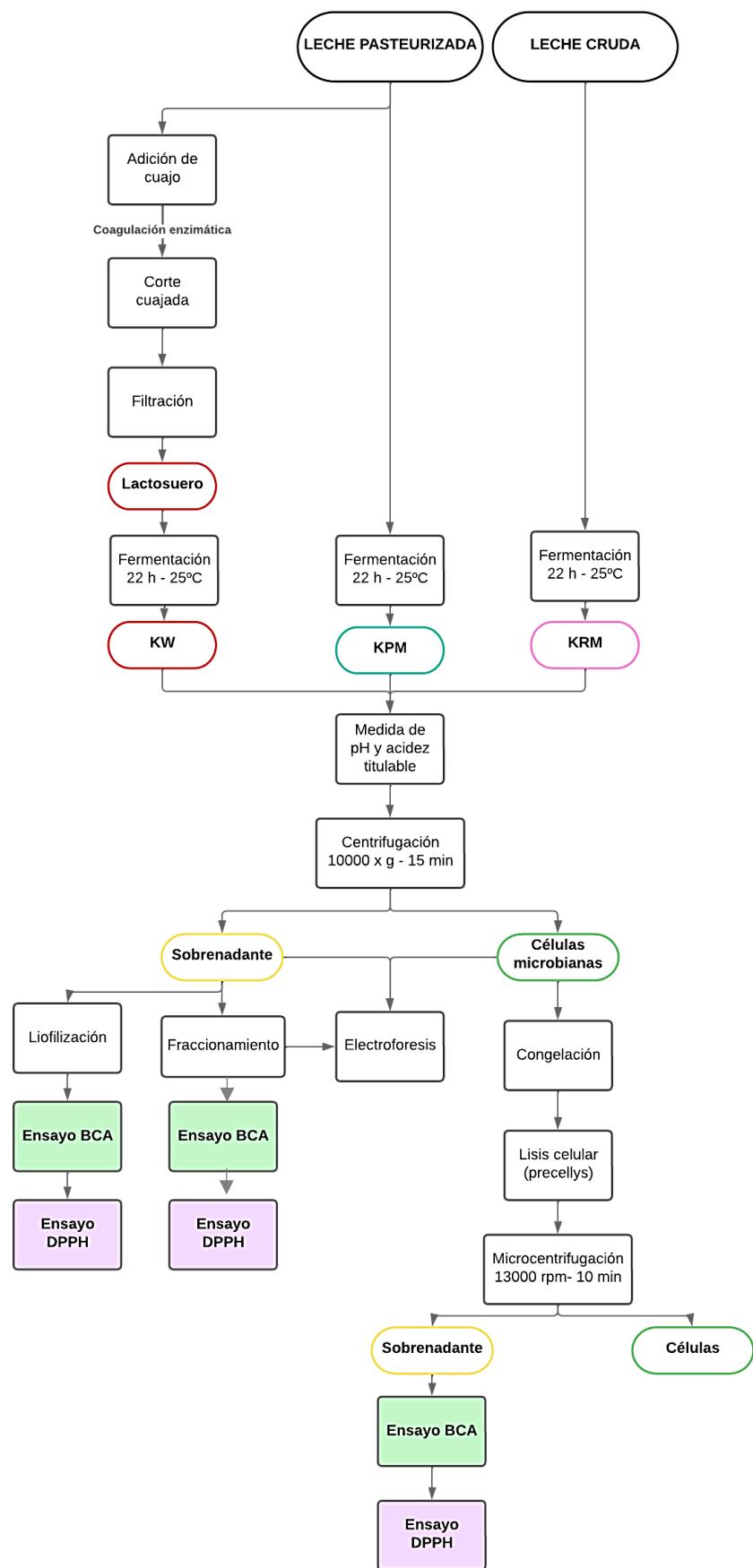


Figura 2: Diagrama de elaboración y procesado de los diferentes tipos de kéfir.

4.2.2. Determinación de pH

Tras la fermentación de los productos de kéfir se determinó el pH con ayuda de un pHmetro. La determinación de pH se hizo en cada muestra que se retiraba cada semana de la cámara de refrigeración para su análisis, a lo largo de cuatro semanas, para ver la evolución con el tiempo de almacenamiento en refrigeración a 4°C.

4.2.3. Determinación de la acidez titulable

También se determinó la acidez titulable de los productos de kéfir. La valoración se efectuó con NaOH 1/9 N, utilizando fenoltaleína como indicador. Este procedimiento se realizó con 1 g de kéfir que se disolvió en 10 mL de agua miliQ, se anotó el volumen en mL de NaOH gastados y los resultados se expresaron en grados Dornic (°D) multiplicando por 10 y por el factor de dilución (x10). Este procedimiento también se realizó con las muestras de kéfir que se retiraban cada semana de la cámara de refrigeración para su análisis, a lo largo de cuatro semanas.

4.2.4. Determinación del contenido en proteína

Este ensayo se llevó a cabo con el propósito de conocer la concentración de proteína de cada muestra para poder expresar los resultados posteriores de la actividad antioxidante en relación a la cantidad de proteína.

Para realizar esta determinación se llevó a cabo el ensayo del ácido bicinconílico o BCA, utilizando el Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, E.UU.). Esta es una técnica colorimétrica para la determinación de las proteínas totales, la reacción colorimétrica se consigue con la reducción por las proteínas del Cu (II) a Cu (I) en medio alcalino, el producto de la reacción tendrá un color púrpura formado por el complejo de BCA con el ion Cu (I) y ese complejo se podrá medir a 562 nm. Además, el color púrpura irá aumentando de manera lineal con el incremento de proteína, esto permitirá la elaboración de una curva patrón que en nuestro caso se realizó con albúmina sérica bovina (BSA).

La preparación de los estándares se hizo disolviendo 2 mg de BSA liofilizada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en 1 mL de agua mili Q (solución Z). Tras esto se realizaron la serie de diluciones que se indica debajo siguiendo el protocolo para la elaboración de la recta:

- A: 2000 µg/mL (300 µL de Z+ 0 µL de agua mili Q)
- B: 1500 µg/mL (375 µL de Z+ 125 µL de agua mili Q)

- C: 1000 µg/mL (325 µL de Z+ 325µL de agua mili Q)
- D: 750 µg/mL (175 µL de B + 175 µL de agua mili Q)
- E: 500 µg/mL (325 µL de C+ 325 µL de agua mili Q)
- F: 250 µg/mL (325 µL de E+ 325 µL de agua mili Q)
- G: 125 µg/mL (325 µL de F+ 325 µL de agua mili Q)
- H: 25 µg/mL (100 µL de G+ 400 µL de agua mili Q)
- I: 0 µg/mL (400 µL de agua mili Q)

Para la preparación de las muestras de las fracciones de kéfir se pesó 1 mg del liofilizado y se disolvió en 1 mL de agua mili Q, agitando con la ayuda de un agitador vórtex para asegurar la correcta disolución. En las muestras procedentes de las células microbianas, se realizó una dilución 1/5 del extracto obtenido tras la ruptura mecánica y la centrifugación.

En cuanto a los reactivos, se elaboró el “working reagent” (WR), compuesto por otros dos reactivos denominados A y B, se prepararon en una concentración de (50:1), respectivamente. Para calcular el volumen necesario para el ensayo se siguió la siguiente fórmula:

$$ml \text{ necesarios de WR} = (nº \text{ estándares (9)} + nº \text{ muestras (6)}) \times (2 \text{ duplicados}) \times (0,2ml \text{ necesarios para cada pocillo}) = 6 \text{ mL necesarios.}$$

Tanto las muestras como los estándares se depositaron en una placa de 96 pocillos para que se produjera la reacción y para la medida de la absorbancia al finalizar esta. En cada pocillo de la placa se colocaron 25 µL de los estándares de BSA o de las muestras y luego 200 µL de WR en todos los pocillos. Tanto las muestras como los estándares se analizaron por duplicado.

La placa se incubó en una estufa a 37°C durante 30 min en oscuridad y se midió en un lector de placas ELISA (Multiskan SM, Helsinki, Finlandia) cuando alcanzó el máximo de la reacción, a la longitud de onda de 562 nm.

Con los resultados obtenidos se realizó la media de las absorbancias de los duplicados y se elaboró la curva patrón con los datos de los estándares de albúmina, se calculó la ecuación de la recta y con esta ecuación y las absorbancias de las muestras se obtuvo la concentración de proteína expresada en µg/mL.

4.2.5. Determinación de la actividad antioxidante

Para la evaluación de la capacidad antioxidante de las fracciones de los diferentes productos de kéfir utilizamos el método DPPH cuyo fundamento se ha explicado previamente en la introducción. Este método está basado también en una técnica colorimétrica en la que el color

púrpura inicial pasa a una tonalidad amarilla con menor absorbancia a 520 nm cuando los compuestos que se analizan ejercen su actividad antioxidante. Para que se produzca esta reacción hace falta realizar una correcta preparación de los reactivos siguiendo el siguiente protocolo:

- DPPH: Para su elaboración se pesaron 2,2 mg de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Sigma-Aldrich) y se disolvieron en 25 mL de etanol al 99,9% en un matraz aforado de 50 mL, tras la agitación en un agitador magnético durante 30 min, y una vez comprobado que está bien disuelto, se añadieron 25 mL de agua mili Q y se enrasó el matraz al volumen final para conseguir la relación etanol:agua 50:50, alcanzando una concentración final del DPPH de 0,11 mM.
- Trolox: En este caso se pesaron 10 mg de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Sigma-Aldrich) y se disolvieron en un matraz aforado de 50 mL, primero con 25 mL de etanol y tras su correcta disolución se añadieron 25 mL de agua mili Q enrasando el matraz al volumen final, así se consiguió una concentración final del Trolox de 800 μ M (disolución A).

También se elaboró una curva patrón utilizando Trolox como reactivo de referencia con las siguientes diluciones:

- A: 800 μ M
- B: 200 μ M (200 μ L de A+ 800 μ L de agua mili Q)
- C: 150 μ M (750 μ L de B+ 250 μ L de agua mili Q)
- D: 100 μ M (125 μ L de A+ 825 μ L agua mili Q)
- E: 50 μ M (500 μ L de A+ 500 μ L agua mili Q)
- F: 20 μ M (400 μ L de E+ 600 μ L de agua mili Q)
- G: 10 μ M (500 μ L de F+ 500 μ L agua mili Q)
- H: 5 μ M (500 μ L de G+ 500 μ L agua mili Q)
- I: 0 μ M (500 μ L agua mili Q)

Para la preparación de las muestras de los sobrenadantes obtenidos tras centrifugar el kéfir y liofilizadas se pesaron 20 mg y se disolvieron en 1 mL de una mezcla etanol:agua, esta vez añadiendo primero 500 μ L de agua mili Q y tras su disolución los otros 500 μ L de etanol al 99,9%. Se prepararon las siguientes diluciones de las muestras y se dejaron en agitación durante 30 min:

- A: 20 mg/L
- B: 10 mg/L (500 μ L de A+ 500 μ L agua mili Q)

- C: 5 mg/L (500 µL de B+ 500 µL agua mili Q)
- D: 2 mg/L (400 µL de C + 600 µL de agua mili Q)
- E: 1 mg/L (500 µL de D+ 500 µL agua mili Q)
- F: 0,5 mg/L (500 µL de E+ 500 µL agua mili Q)

Tras la preparación de todas las diluciones se pusieron en una placa de 96 pocillos los volúmenes correspondientes de los diferentes reactivos, en el caso del Trolox y de la muestra se colocaron 50 µL en cada pocillo y luego 150 µL de DPPH o de una mezcla de etanol:agua para igualar los volúmenes en los pocillos que no llevaban DPPH. Tanto las muestras como el Trolox se analizaron por duplicado.

La placa se incubó en una estufa a 37°C durante 1 h en oscuridad y tras la reacción se midió a una longitud de onda de 520 nm en el espectrofotómetro (Spectrostar, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania), tras la obtención de los resultados de las absorbancias se realizó la media de los duplicados y se aplicaron las siguientes fórmulas para calcular el % de reducción de DPPH:

$$\text{Abs control} = \text{Abs}_{520 \text{ nm}} \text{ control con DPPH} - \text{Abs}_{520 \text{ nm}} \text{ control sin DPPH}$$

$$\text{Abs muestra} = \text{Abs}_{520 \text{ nm}} \text{ muestra con DPPH} - \text{Abs}_{520 \text{ nm}} \text{ control sin DPPH}$$

$$\% \text{ Red DPPH} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \times 100$$

Con los porcentajes de reducción de DPPH obtenidos para cada concentración de los estándares de Trolox, se obtuvo la curva patrón para obtener la ecuación de la recta y poder sustituir en ella los valores de reducción de DPPH correspondientes a las muestras y así expresar la capacidad antioxidante como µM de Trolox. Además, con los resultados del contenido en proteína de las muestras que se obtuvieron mediante el método del BCA, se pudieron expresar los resultados en µM Trolox/mg proteína y por lo tanto, relacionar la capacidad antioxidante con la cantidad de proteína y poder comparar las diferentes muestras entre sí. Los resultados de capacidad antioxidante también se expresaron en relación a los mg de producto, en concreto, en relación a los 10 mg en todas las muestras. Se analizaron cuatro réplicas de las muestras en experimentos independientes.

4.2.6. Electroforesis con SDS (SDS-PAGE)

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) y el agente reductor mercaptoetanol para conseguir la separación de las proteínas por su peso

molecular a través de un campo eléctrico, y poder visualizar así las diferentes bandas de las proteínas.

Para ello, se utilizó un equipo denominado Mini-Protean Tetra Cell con geles comerciales Mini-Protean de poliacrilamida en gradiente 4-20% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.)

Las muestras de los liofilizados de los sobrenadantes se prepararon a una concentración de 1 mg/mL y se mezclaron con 20 µL de un tampón compuesto por Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, con 2% SDS, 25% glicerol, 0,01% azul de bromofenol y 5% de 2-mercaptopropano. Tras la mezcla, las muestras se hirvieron durante 5 min. Para las muestras que fueron sometidas a un fraccionamiento por ultrafiltración, la concentración utilizada fue de 10 mg/mL.

Se introdujeron 15 µL de cada muestra en los pocillos de los geles y se anotó el orden de colocación de estas. Además, se utilizó un marcador de peso molecular como estándar en el primer pocillo, en concreto, el Page Ruler Prestained Protein Ladder (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

Seguidamente, se aplicó un voltaje de 180 V durante 30 min con el equipo Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia, Estocolmo, Suecia).

Tras la finalización de la electroforesis se realizó una tinción con azul de Coomassie formado por 0,65 g/L de azul R-250 de Coomassie (Serva, Heidelberg, Alemania) disuelto en metanol, ácido acético, glicerol y agua destilada. El gel se dejó con el colorante durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave. Tras eso se añadió el decolorante y se dejó media hora más en agitación suave y temperatura ambiente hasta que se pudieron observar las bandas coloreadas. Finalmente, se escaneó el gel para poder visualizar correctamente los resultados.

4.2.7. Fraccionamiento de los sobrenadantes del kéfir

También se realizó un fraccionamiento por ultrafiltración de aquellos sobrenadantes de kéfir que presentaban mayor actividad antioxidante para evaluar si esa actividad está asociada con alguna fracción en concreto.

Se prepararon 4 mL de las muestras liofilizadas a una concentración de 10 mg/mL y se agitaron durante 15 min para su completa disolución. Se introdujeron los 4 mL en los tubos de ultrafiltración del modelo Ultracel-10 K (Milipore, Darmstadt, Alemania) y se centrifugaron a 4000 x g durante 5 min. Se obtuvieron las dos fracciones de >10 kDa y <10 kDa, y con ellas se realizaron los ensayos de DPPH, BCA y electroforesis con SDS.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación del pH y acidez titulable

Los valores obtenidos en la medida de pH y acidez de los diferentes tipos de kéfir tras el tiempo de fermentación y a lo largo del almacenamiento en refrigeración fueron los que se incluyen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Valores de pH y acidez de los diferentes tipos de kéfir en función del sustrato lácteo (KW: kéfir de lactosuero; KPM: kéfir de leche pasteurizada; KRM: kéfir de leche cruda), el cultivo iniciador (B y C) y la semana de almacenamiento en refrigeración (1: tras la fermentación; 2: 7 días; 3: 14 días).

MUESTRA	pH	Acidez (°Dornic)
KW 1B	4,31	40
KW 1C	4,24	40
KW 2B	4,37	40
KW 2C	4,41	30
KW 3B	4,48	40
KW 3C	4,6	40
KPM 1B	4,42	50
KPM 1C	4,28	60
KPM 2B	4,47	60
KPM 2C	4,46	60
KPM 3B	4,58	60
KPM 3C	4,69	70
KRM 1B	4,70	70
KRM 1C	4,40	80
KRM 2B	5,4	70
KRM 2C	4,70	70

Los resultados se corresponden con las determinaciones realizadas tras la fermentación y en la primera y segunda semana tras la fermentación, salvo en el caso de la leche cruda que solo se realizó la determinación tras la primera semana de almacenamiento.

Previamente, se midió la acidez y el pH de la leche entera que se iba a utilizar para la elaboración del kéfir para poder comprobar su calidad. En cuanto a la acidez el valor obtenido para la leche pasteurizada fue de 17°D siendo adecuado, ya que para una calidad óptima la acidez de la leche debe ser de entre 15-18°D. El valor del pH fue de 6,72 también en el

intervalo normal de 6,6-6,8. En cuanto a la leche cruda el pH fue de 6,6 mientras que la acidez fue de 16 °D, también dentro de los valores normales.

Tras 22 h de fermentación, el pH del kéfir de lactosuero ya estaba en 4,34 y observando los valores de la tabla vemos que el pH no varió mucho aunque aumentó ligeramente a lo largo del tiempo. La acidez se mantuvo más o menos constante, aunque hubo un valor más bajo para el KW2C, que pudo deberse a un error en la valoración. Estos valores indican que la refrigeración detiene el proceso de fermentación completamente, puesto que no hay acidificación posterior a la fermentación.

Esta bajada tan rápida de la acidez puede ser debida a la utilización de microrganismos iniciadores comerciales, ya que según un estudio llevado a cabo por Yilmaz-Ersan et al. (2018) el kéfir elaborado de manera tradicional con los granos de kéfir, posee una acidificación más lenta, siendo menos eficaz que los cultivos comerciales en el descenso del pH.

Aun así podemos observar diferencias entre el kéfir de lactosuero y el de leche pasteurizada, sobre todo en relación a la acidez, siendo la acidez del kéfir de leche pasteurizada superior a la del kéfir de lactosuero. Esto es lógico puesto que la acidez no solo es debida al contenido en ácidos, sino también a los fosfatos, citratos y proteínas, y hay que considerar que la leche tiene un mayor contenido proteico que el lactosuero.

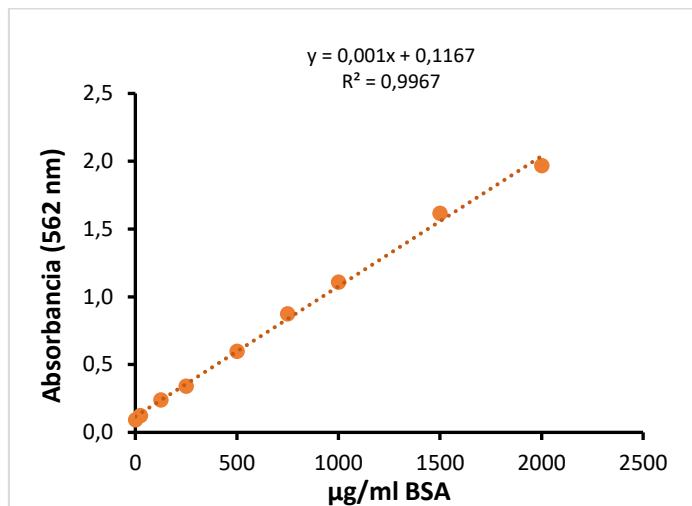
En el kéfir de leche cruda se obtuvieron valores de pH y acidez más altos, en general, que para los otros tipos de kéfir. Es posible que el pH no haya descendido tanto porque la microbiota natural de la leche haya establecido algún tipo de antagonismo con los cultivos del kéfir.

Se realizó la prueba de la fosfatasa alcalina en la leche pasteurizada y el resultado fue negativo, verificando que había sufrido un tratamiento de pasteurización suficiente para garantizar una buena calidad higiénica. En la leche cruda, como era de esperar, dio positivo ya que al no ser sometida a ningún tratamiento térmico la actividad del enzima seguía presente.

La prueba de la lactoperoxidasa dio negativo en el caso de la leche pasteurizada, lo que significa que la enzima no estaba activa y por lo tanto, el tratamiento de pasteurización había sido bastante intenso. En la leche cruda la prueba de la lactoperoxidasa dio positivo, como podía esperarse.

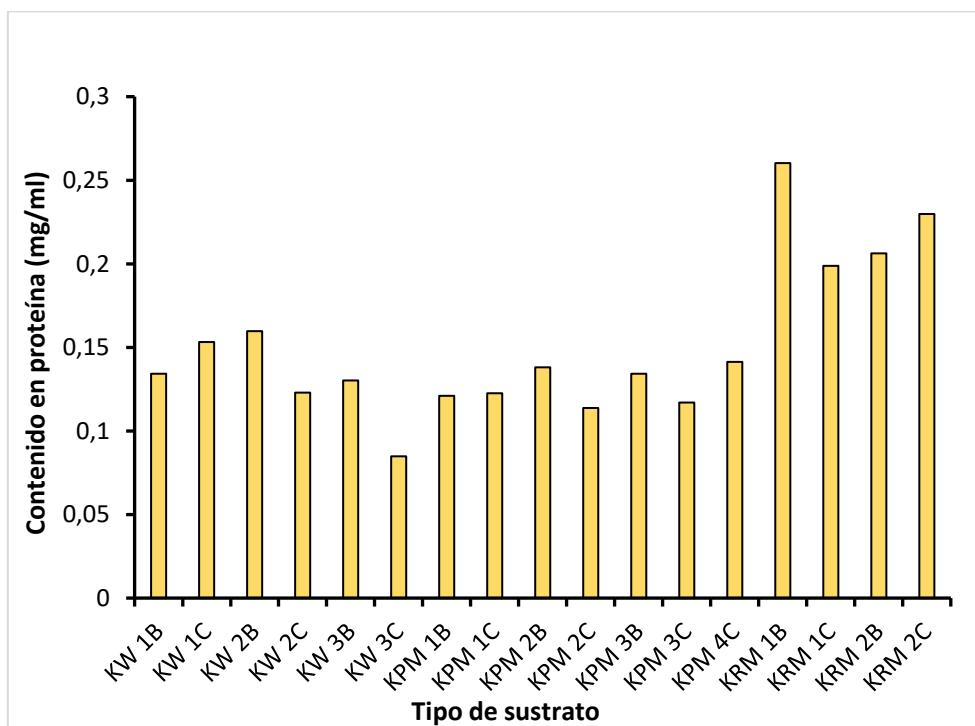
5.2. Determinación del contenido en proteína

La siguiente gráfica muestra una curva patrón de albúmina sérica bovina de referencia utilizada durante los ensayos:



Gráfica 2: Curva patrón elaborada con distintas concentraciones (0, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 µg/ml) de albumina sérica bovina en función de la absorbancia, para determinar la cantidad de proteína de las fracciones obtenidas de los diferentes tipos de kéfir.

Los resultados obtenidos en el ensayo BCA sobre 1 mg de muestra liofilizada por ml se muestran en la siguiente gráfica:

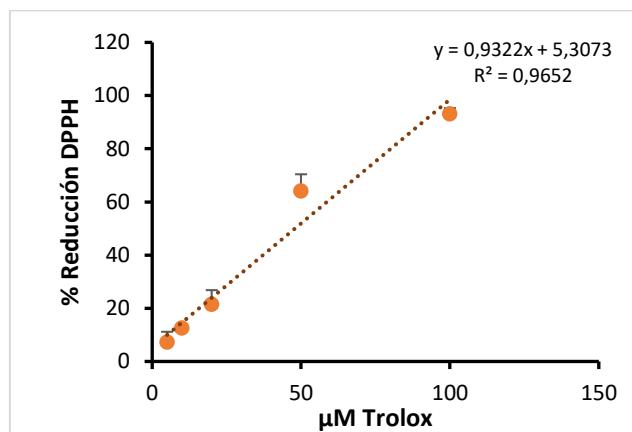


Gráfica 3: Contenido en proteína de los sobrenadantes de las diferentes muestras de kéfir en función del sustrato lácteo (KW: kéfir de lactosuero; KPM: kéfir de leche pasteurizada; KRM: kéfir de leche cruda), el cultivo iniciador (B y C) y la semana de almacenamiento en refrigeración (1: tras la fermentación; 2: 7 días; 3: 14 días; 4: 21 días).

Se puede observar como los sobrenadantes del kéfir de leche cruda (KRM) tienen un contenido de proteínas totales mayor que las otras muestras, debido a que al no haber sufrido ningún tipo de tratamiento térmico las proteínas no se han desnaturalizado y no han precipitado con los microorganismos en la centrifugación. En cambio, los sobrenadantes de los otros tipos de kéfir tienen un contenido de proteína menor que los del kéfir de leche cruda. Es posible que el tratamiento térmico de la leche pasteurizada haya desnaturalizado una parte de las proteínas y estas hayan precipitado en la centrifugación que se realizó para separar los sobrenadantes. En el caso del lactosuero, la concentración del sustrato original ya tiene un contenido en proteína más bajo que los otros sustratos.

5.3. Determinación de la capacidad antioxidante

La siguiente gráfica muestra la curva patrón que se utilizó como referencia para el ensayo de la determinación de la capacidad antioxidante.



Gráfica 4: Curva patrón con distintas concentraciones de Trolox (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) en función del % reducción de DPPH para determinar la capacidad antioxidante de los sobrenadantes liofilizados. Los valores representan la media \pm la desviación estándar de las tres réplicas elegidas como representación de todas las obtenidas.

Como se ha explicado en la metodología experimental, las muestras se prepararon a las concentraciones de: 20, 10, 5, 2, 1 y 0,5 mg/ml. En las siguientes tablas se muestran los valores obtenidos en dos muestras como ejemplo:

KW 2B	mg/ml	%Red DPPH
	20	57,20
	10	13,48
	5	4,06
	2	3,67
	1	4,49
	0,5	3,48

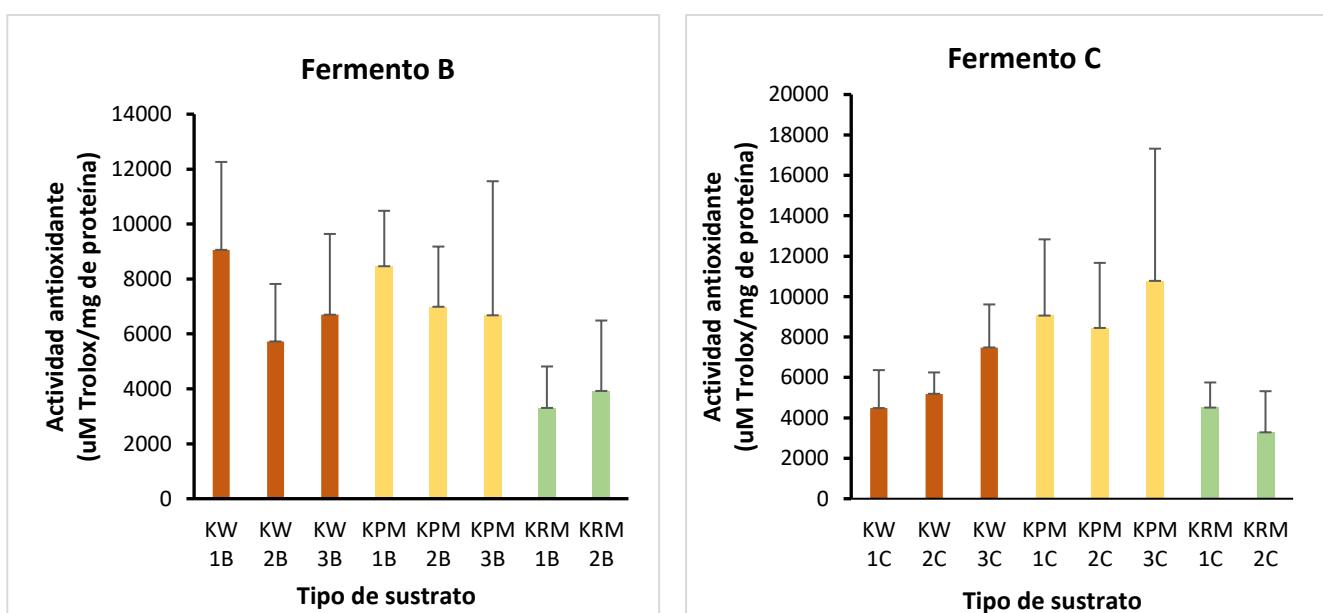
Tabla 2: Valores de % reducción de DPPH de la muestra KW 2B del sobrenadante liofilizado a concentraciones de 20, 10, 5, 2, 1 y 0,5 mg/ml.

KW 2C	mg/ml	% Red DPPH
	20	65,08
	10	43,85
	5	13,69
	2	15,80
	1	4,71
	0,5	-8,39

Tabla 3: Valores de % reducción de DPPH de la muestra KW 2C del sobrenadante liofilizado a concentraciones de 20, 10, 5, 2, 1 y 0,5 mg/ml.

Se observa que a menores concentraciones, los resultados no muestran una relación proporcional con el % de reducción de DPPH, esto es debido a que en todas las muestras por debajo de 10 mg/ml los compuestos antioxidantes no presentaban una reacción suficiente con el DPPH. Lo mismo sucedía a concentraciones bajas de Trolox. Por este motivo, se decidió realizar los ensayos y expresar los resultados solo con 10 mg/ml de muestra.

Se han representado en gráficas los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante de los diferentes tipos de kéfir y fracciones en unidades de μM Trolox/mg proteína ya que el Trolox se utilizó como referencia de actividad antioxidante, diferenciando entre el tipo de fermento, tipo de sustrato y tiempo de almacenamiento en refrigeración para poder comparar entre ellos.



Gráfica 5: Actividad antioxidante de los sobrenadantes de los diferentes tipos de kéfir utilizando el fermento B tras la fermentación (1), a los 7 días (2) y a los 14 días (3) en refrigeración. KW: kéfir de lactosuero, KPM: kéfir de leche pasteurizada, KRM: kéfir de leche cruda. Los valores representan la media ± desviación estándar de las 4 réplicas realizadas en experimentos independientes.

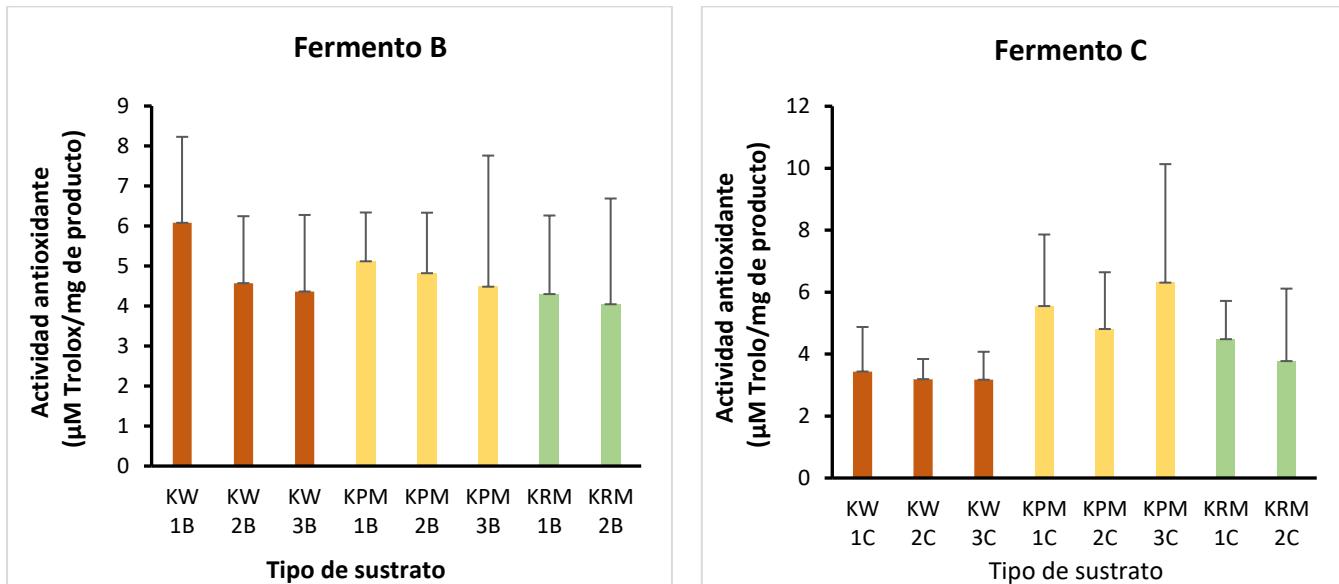
Gráfica 6: Actividad antioxidante de los sobrenadantes de los diferentes tipos de kéfir utilizando el fermento C tras la fermentación (1), a los 7 días (2) y a los 14 días (3) en refrigeración. KW: kéfir de lactosuero, KPM: kéfir de leche pasteurizada, KRM: kéfir de leche cruda. Los valores representan la media ± desviación estándar de las 4 réplicas realizadas en experimentos independientes.

Los resultados muestran, en general, una oscilación en la actividad antioxidante. En algunos casos, la actividad aumenta a lo largo del almacenamiento, como es el caso del kéfir de lactosuero y de leche pasteurizada con fermento C y en otros casos disminuye, como en el kéfir de lactosuero y en el de leche pasteurizada con fermento B.

También se puede observar, que en los kéfires elaborados con el fermento C el sobrenadante del kéfir de leche pasteurizada presenta una actividad mayor que los de lactosuero y leche cruda. Esto puede deberse a la presencia de péptidos procedentes de la

hidrólisis proteica de las caseínas que no estaban presentes en el lactosuero. En estudios como el de García Mora (2018), se han encontrado péptidos derivados de la k-caseína con actividad de eliminación de radicales DPPH en leche fermentada con *Lactobacillus bulgaricus*.

Asimismo, se representaron los datos de actividad antioxidante según $\mu\text{M TROLOX}/\text{mg producto}$, obteniéndose las siguientes gráficas:



Gráfica 7: Actividad antioxidante de los sobrenadantes de los diferentes tipos de kéfir utilizando el fermento B tras la fermentación (1), a los 7 días (2) y a los 14 días (3) en refrigeración. KW: kéfir de lactosuero, KPM: kéfir de leche pasteurizada, KRM: kéfir de leche cruda. Los valores representan la media \pm desviación estándar de las 4 réplicas realizadas en experimentos independientes.

Gráfica 8: Actividad antioxidante de los sobrenadantes de los diferentes tipos de kéfir utilizando el fermento C tras la fermentación (1), a los 7 días (2) y a los 14 días (3) en refrigeración. KW: kéfir de lactosuero, KPM: kéfir de leche pasteurizada, KRM: kéfir de leche cruda. Los valores representan la media \pm desviación estándar de las 4 réplicas realizadas en experimentos independientes.

Al expresar la actividad antioxidante en relación a los mg de producto liofilizado, se aprecian notables diferencias en el kéfir de leche cruda respecto a los resultados de actividad expresados en función de los mg de proteína. Así, en los del fermento B la actividad del sobrenadante del kéfir de leche cruda es más parecida a la actividad del kéfir de leche pasteurizada, y en los del fermento C la actividad del sobrenadante del kéfir de leche cruda es algo superior al del kéfir de lactosuero.

Estas diferencias se deben a que la leche cruda tiene mayor contenido en proteínas, como hemos demostrado anteriormente con los resultados del ensayo del BCA. Por lo tanto, al relacionar los resultados de $\mu\text{M Trolox}$ en relación a la proteína nos muestra una actividad antioxidante menor que las otras leches con menor concentración de proteína. Así, podemos concluir que aunque las proteínas lácteas son una fracción importante que tiene gran

influencia en las propiedades antioxidantes del kéfir, a su vez hay otro tipo de compuestos no proteicos que también contribuyen a su capacidad antioxidant.

Según los resultados de algunos estudios como el de Yilmaz-Ersan et al. (2018) la actividad antioxidante del kéfir depende de numerosos factores, ya sean el tipo de leche y su composición, las condiciones de procesado, el tipo y cantidad de cultivo iniciador, los tipos de enzimas que producen los microorganismos que lo integran, el grado de hidrólisis de las proteínas e incluso la capacidad de los factores antioxidantes que se generan en la fermentación para donar átomos de hidrógeno y electrones. Todas estos factores condicionantes tienen como consecuencia una variabilidad en la actividad de los compuestos antioxidantes y por lo tanto, resultados discordantes entre diferentes estudios.

Además, hay que considerar que los análisis de la capacidad antioxidante están muy influenciados por el método elegido para medirla, ya que cada uno posee un mecanismo de reacción diferente. Por ejemplo en el estudio de Yilmaz-Ersan et al. (2018) la mayor actividad antioxidante del kéfir de leche de oveja y de vaca se obtuvo cuando se evaluó mediante el ensayo de ABTS mientras que la más baja se obtuvo mediante el ensayo DPPH.

Por este motivo, cada estudio realizado sobre la actividad antioxidante obtiene conclusiones diferentes. Según el estudio de Yilmaz-Ersan et al. (2018), los valores de actividad antioxidante del kéfir según el método del DPPH se incrementaban con el tiempo de almacenamiento en refrigeración debido a la proteólisis (que como ya hemos mencionado es uno de los principales factores que aumentan la capacidad antioxidante) o por el incremento del contenido de los ácidos orgánicos resultantes de la post-acidificación durante el almacenamiento. En este trabajo este aumento de actividad antioxidante se apreció para el kéfir de leche de oveja en la segunda semana, a partir de la cual la capacidad antioxidante aumentó ligeramente. Esto puede deberse a que algunos de los componentes del kéfir presentan al principio un bajo potencial antioxidante, como las proteínas más grandes que se hidrolizan más lentamente. Sin embargo, en el kéfir de leche de vaca los valores máximos de DPPH se obtuvieron en el 7 día de almacenamiento para disminuir después. Los resultados de nuestro estudio no muestran una tendencia clara en el almacenamiento en refrigeración, podríamos decir que, en general, la actividad antioxidante disminuye con el tiempo aunque no en todas las muestras.

Según Egea et al. (2022) durante la fermentación las diferentes bioactividades, incluida la antioxidante, pueden aumentar. Esto ocurre con los radicales libres cuya eliminación se incrementa a lo largo de la fermentación o incluso por la liberación de compuestos fenólicos

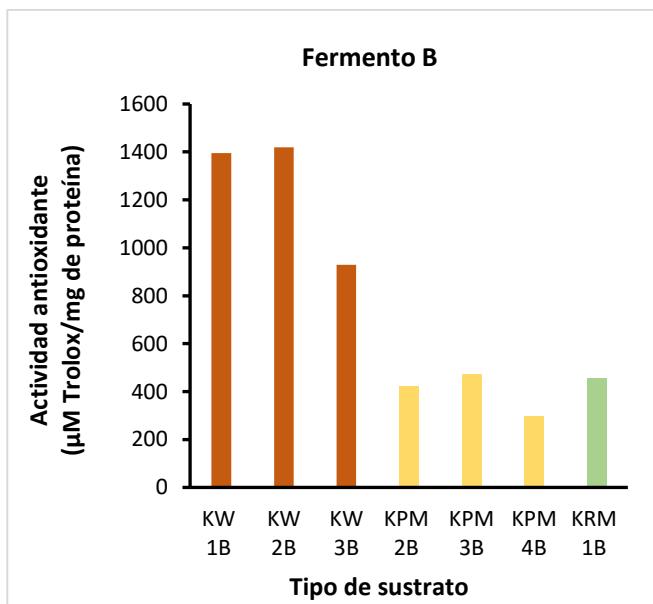
unidos a los azúcares que son metabolizados por las enzimas de los microrganismos en la fermentación.

Sin embargo, según Virtanen et al. (2007), el desarrollo de la actividad antioxidante dependía de la cepa de microorganismos utilizada y, en general, aumentaba durante la fermentación, pero no estaba directamente relacionado con el tiempo de fermentación.

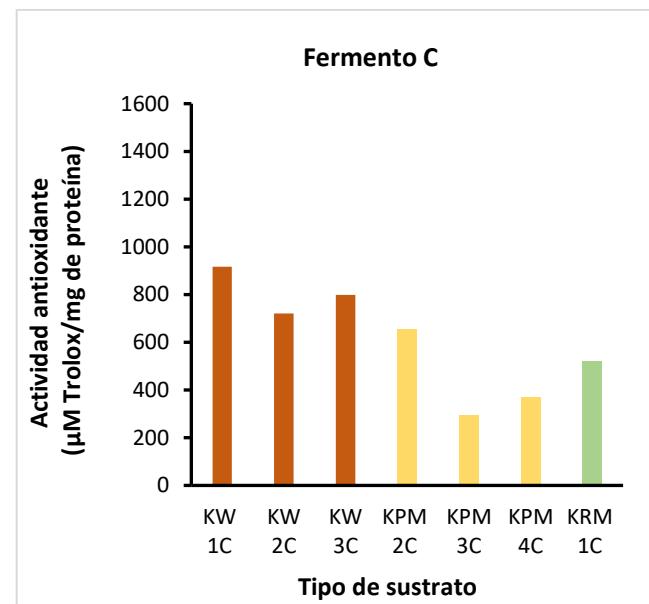
Además en relación con los componentes del lactosuero, varios péptidos derivados de sus proteínas mayoritarias, como son la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina, han demostrado tener una alta capacidad antioxidante (Corrochano et al., 2018).

5.4. Actividad antioxidante de la fracción microbiana del kéfir

Seguidamente se muestran los resultados obtenidos de los ensayos en relación a la capacidad antioxidante de los extractos procedentes de las células microbianas que se obtuvieron por centrifugación del kéfir se lisaron por ruptura mecánica y se centrifugaron para eliminar los restos celulares.



Gráfica 9: Actividad antioxidante de la fracción microbiana de los diferentes tipos de kéfir utilizando el fermento B tras la fermentación (1), a los 7 días (2), a los 14 días (3) y a los 21 días (4) en refrigeración. KW: kéfir de lactosuero, KPM: kéfir de leche pasteurizada, KRM: kéfir de leche cruda.



Gráfica 10: Actividad antioxidante de la fracción microbiana de los diferentes tipos de kéfir utilizando el fermento C tras la fermentación (1), a los 7 días (2), a los 14 días (3) y a los 21 días (4) en refrigeración. KW: kéfir de lactosuero, KPM: kéfir de leche pasteurizada, KRM: kéfir de leche cruda.

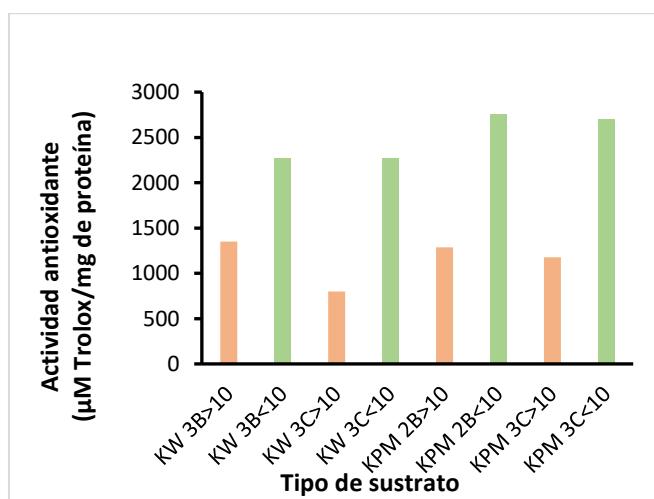
La principal diferencia con los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante de los correspondientes sobrenadantes del kéfir es la mayor actividad del extracto de las células del kéfir de lactosuero en comparación con los extractos de los otros kéfires, apreciándose sobre todo en el kéfir obtenido con el fermento B.

Esto puede deberse a que el fermento B incluye *Leuconostoc mesenteroides* a diferencia del fermento C que no lo contiene. Según estudios realizados por García Mora (2018), la actividad de esta bacteria ha demostrado una mayor producción de péptidos de bajo peso molecular en el proceso de fermentación y tiende a aumentar la actividad antioxidante al final de la fermentación.

Al eliminar las células, determinamos que esa actividad antioxidante se origina en productos de lisis celular o metabolitos extracelulares y que esta depende más de las enzimas proteolíticas bacterianas que de los propios microorganismos (*Virtanen et al.*, 2007). Sin embargo, hemos visto que el material intracelular de las bacterias lácticas también posee actividad antioxidante.

5.5. Actividad antioxidante de las muestras fraccionadas

También se evaluó la actividad antioxidante de los sobrenadantes de algunos de los kéfirs fraccionándolos por ultrafiltración según su peso molecular, obteniendo una fracción de >10 kDa y otra de <10 kDa.



Gráfica 11: Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas por ultrafiltración de los sobrenadantes de algunos tipos de kéfir, con una membrana de punto de corte de 10 kDa. Fracciones de más de 10 kDa de peso molecular (>10) y de menos de 10 kDa de peso molecular (<10).

Los resultados indican que las fracciones <10kDa de todos los tipos de kéfir presentaron una mayor actividad antioxidante que las fracciones 10 kDa. Al estar expresados los valores de actividad antioxidante en relación al contenido de proteína, las fracciones con mayor cantidad de proteína, que son las que no atravesaron la membrana, poseen un actividad relativa menor.

Sin embargo, las fracciones que atravesaron la membrana poseen una capacidad antioxidante notablemente superior. Esto es debido, probablemente, a los péptidos de bajo peso molecular

(<10 kDa) que se han encontrado en algunos estudios como los responsables de la actividad antioxidante debido a su capacidad de eliminar los radicales libres y sus propiedades quelantes de los iones metálicos (*Liu et al., 2005; Sodanlo, A., y Azizkhani, M., 2021*).

5.6. Análisis de la composición proteica de las fracciones del kéfir por SDS-PAGE

En las siguientes figuras se observan los resultados de las electroforesis con SDS, de las fracciones obtenidas de los diferentes tipos de kéfir.

GEL 1

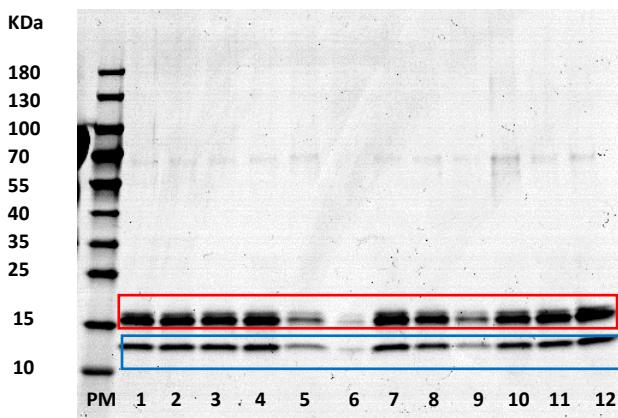


Figura 3: SDS-PAGE en gel de poliacrilamida en gradiente 4-20% teñido con azul de Coomassie. Las muestras analizadas se corresponden con los sobrenadantes de los kéfires en el orden siguiente: (PM) Marcador de peso molecular, (1) KPM 3C, (2) KPM 3B, (3) KPM 2C, (4) KPM 2B, (5) KPM 1C, (6) KPM 1B, (7) KW 3C, (8) KW 3B, (9) KW 2C, (10) KW 2B, (11) KW 1C, (12) KW 1B.

GEL 2

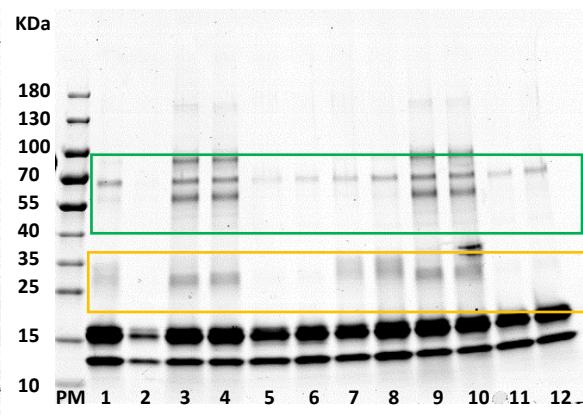


Figura 3: SDS-PAGE en gel de poliacrilamida en gradiente 4-20% teñido con azul de Coomassie. Las muestras analizadas son los extractos de las fracciones microbianas de los kéfires, en el orden siguiente: (PM) Marcador de peso molecular, (1) KPM 1B, (2) KPM 1C, (3) KRM 1B, (4) KRM 1C, (5) KW 1B, (6) KW 1C, (7) KPM 2B, (8) KPM 2C, (9) KRM 2B, (10) KRM 2C, (11) KW 2B, (12) KW 2C.

En la figura 3 se pueden observar solamente dos bandas destacables en todas las muestras, la banda recuadrada en rojo que es la β -lactoglobulina de 18 kDa, que está en mayor cantidad como indica el grosor de la banda. La otra banda destacable recuadrada en azul, es la α -lactalbúmina de 14 kDa, segunda proteína mayoritaria de la leche de vaca.

En la figura 4, sin embargo, observamos mayor cantidad de bandas de proteína. Al igual que en el gel 1 se pueden identificar las de menor peso molecular, como la β -lactoglobulina y la α -lactalbúmina. Asimismo, se pueden visualizar recuadradas en amarillo los diferentes tipos de caseínas, que en este caso se han separado con las células microbianas en la centrifugación agregadas con ellas, debido a que han alcanzado su punto isoeléctrico que es 4,6 y coincide con el alcanzado al finalizar la fermentación.

En el cuadro verde se localizan otro tipo de proteínas que se pueden observar sobre todo en el kéfir de leche cruda debido a que no han sido desnaturalizadas por el tratamiento térmico de pasteurización o bien pueden corresponder también a proteínas de los microorganismos de los cultivos iniciadores.

Además en el gel 2, podemos observar ligeramente la presencia de péptidos, con pequeñas zonas sombreadas por debajo de 10 kDa. Estos péptidos pueden estar originados por la hidrólisis de las proteínas por parte de los microorganismos y suelen tener un peso molecular de entre 4- 20 kDa como se ha descrito en estudios previos (*García Mora, 2018*), en los que se ha demostrado que los fermentados con mayor cantidad de estos péptidos presentaban mayor actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos en la electroforesis con SDS de los extractos de las células microbianas de las muestras que presentaron mayor capacidad antioxidante y sus correspondientes fracciones obtenidas por ultrafiltración se muestran en la siguiente figura.

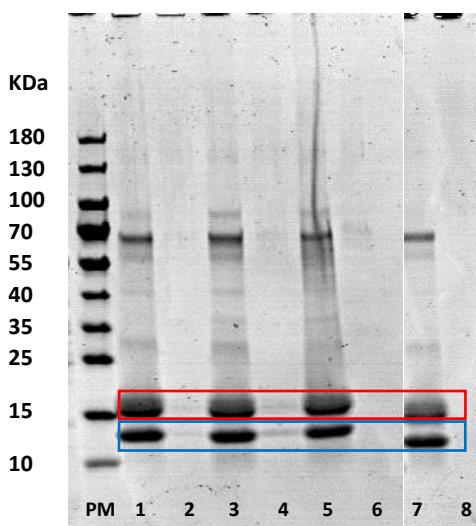


Figura 4: SDS-PAGE en gel de poliacrilamida en gradiente 4-20% teñido con azul de Coomassie de las fracciones obtenidas por ultrafiltración de los sobrenadantes de algunos tipos de kéfir en el siguiente orden: (PM) Marcador de peso molecular (1) KW 3C >10 kDa, (2) KW 3C <10 kDa, (3) KPM 2B >10 kDa, (4) KPM 2B <10 kDa, (5) KPM 3C >10 kDa, (6) KPM 3C <10 kDa, (7) KW 3B >10 kDa, (8) KW 3B <10 kDa.

En la electroforesis se puede observar claramente las proteínas que no atravesaron la membrana de un poro de 10 kDa (1, 3, 5 y 7), que se corresponden con la β -lactoglobulina recuadrada en rojo, y la α -lactalbúmina recuadrada en azul.

En cambio en las muestras correspondientes a la fracción <10 kDa (2, 4, 6 y 8), no se pueden apreciar bandas debido a que las proteínas mayoritarias no atravesaron la membrana y los péptidos que la han atravesado no se han teñido convenientemente con el método utilizado.

En futuras investigaciones sería necesario analizar estos péptidos por técnicas más sensibles como HPLC y espectrometría de masas.

6. CONCLUSIONES

Con este estudio se ha confirmado que el kéfir tiene propiedades bioactivas como la antioxidante y se ha podido concluir que:

1. Las variaciones en la actividad antioxidante del kéfir elaborado con diferentes sustratos se deben principalmente al contenido de proteínas de estos y a su hidrólisis por parte de los microorganismos.
2. Los cultivos iniciadores influyen considerablemente en la actividad antioxidante del kéfir, teniendo gran importancia la elección de los tipos utilizados en la fermentación.
3. El tiempo de almacenamiento en refrigeración del kéfir no ha mostrado una clara influencia en la actividad antioxidante de los diferentes tipos de kéfir, lo que puede ser debido a numerosos factores que pueden causar variabilidad en los resultados.
4. Tanto los productos derivados de la lisis de los cultivos iniciadores como los componentes extracelulares liberados en el kéfir y los derivados de la hidrólisis de las proteínas por la fermentación poseen alta capacidad antioxidant.

CONCLUSIONS

With this study it has been confirmed that kefir has bioactive properties such as antioxidant and it has been concluded that:

1. The variations in the antioxidant activity of kefir made with different substrates are mainly due to their protein content and their hydrolysis by microorganisms.
2. Starter cultures influence considerably the antioxidant activity of kefir, with great importance in choosing the types used for fermentation.
3. The time in cold storage of kefir has not shown a clear influence on its antioxidant activity of the different types of kefir, which may be due to numerous factors that can cause variability in the results.
4. The products derived from the lysis of the starter cultures and the extracellular components released in kefir and those derived from the hydrolysis of proteins by fermentation have high antioxidant capacity.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo me ha ayudado a realizar una búsqueda bibliográfica completa y eficaz, permitiéndome comprender y analizar tanto artículos científicos en español como en inglés. Además he ampliado mis conocimientos respecto a un producto probiótico como es el kéfir y sobre su composición, elaboración y propiedades.

En cuanto al trabajo experimental, he aprendido a realizar nuevos ensayos en el laboratorio y a buscar soluciones a dificultades en el desarrollo de estos. Así como a conocer el funcionamiento de nuevos equipos y tener mayor autonomía a la hora de trabajar. A su vez, he incrementado mis capacidades para la realización e interpretación de resultados y poder verificarlos y discutirlos con evidencias científicas de manera crítica.

También me ha ayudado a estar más preparada en relación a mi futuro laboral, potenciando mis habilidades participativas, personales y de desarrollo completo de metodologías. Incluso he apreciado una mejora a la hora de redactar informes y elaborar de manera correcta un estudio científico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Amorim, G., Coitinho, B., Dias, T., Friques, F., Monteiro, L., Rezende, L., Cunha D., Costa, T., Campagnaro, P., De Pauw, E., Vasquez, C., y Quinton, L. (2019). "Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules." *Food Chemistry*, 282, 109-119. DOI: 9443/10.1016.
- Arslan, S. (2015). "A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir". *CyTA-Journal of Food*, 13(3), 340-345. DOI: 10.1080/19476337.2014.981588.
- Azizi, F., Kumar, R., Yeap, K., Abdullah, O., Khalid, M., Omar, R., Osman, A., Mortadza, S., y Alitheen, B. (2021). "Kefir and its biological activities." *Foods*, 10(6), 1210. DOI:10.3390/10061210.
- Corrochano, R., Buckin, Kelly, M., y Giblin, L. (2018). "Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways." *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4747-4761. DOI: 10.3168/2017-13618.
- Egea, B., Santos, C., Oliveira F., Josemar Gonçalves de Ores, J., Takeuchi, P., y Lemes, C. (2022). "A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health benefits." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(6), 1536-1552. DOI:10.3390/11125575.
- Epstein, E., y Velazco, M. (2020). *Conocimiento, grado de satisfacción y aceptación de kéfir elaborado con agua y de kéfir elaborado con leche de vaca*. Trabajo fin de grado. Universidad de Uruguay.
- Fernández, M. (2017). *Estudio de la comunidad microbiana del kéfir y aislamiento de microorganismos con actividad antimicrobiana*. Trabajo fin de grado. Universidad de Jaén.
- García Mora, C. (2018). *Obtención de un hidrolizado de proteínas de lactosuero adicionado con un probiótico selenizado: capacidad antioxidante y grado de proteólisis*. Tesis. Universidad autónoma de hidalgo.
- Guija Poma, E., Inocente Camones, A., Ponce Pardo, J. y Zarzosa Norabuena, E. (2015). "Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante". *Horizonte Médico (Lima)*, 15(1), 57-60. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727558X2015000100008&script=sci_abstract Consultado el: [4-05-2022].
- Guzel Seydim, Z., Gökirmaklı, Ç, y Greene, K. (2021). "A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties". *Trends in Food Science & Technology*, 113, 42-53. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.04.041.
- Guzmán Romero, X. (2016). *Estudio del contenido proteico en diferentes leches comerciales de vaca en Ecuador y su actividad antioxidante in vitro*. Trabajo fin de grado. Universidad de Ambato.

- Iraporda, C., Júnior, A., Neumann, E., Nunes, C., Nicoli, R., Abraham, G., y Garrote, L. (2017). "Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonism against intestinal pathogens". *Journal of Dairy Research*, 84(3), 339-345. DOI: 10.1017/s0022029917000358.
- Jeong, D., Kim, D., Kang, I., Kim, H., Song, K., Kim, H., y Seo, K. (2017). "Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir". *Food Control*, 78, 436-442. DOI: 10.1016/2017.02.033.
- Juzdado Martos, R. (2018). *Estudio de la comunidad microbiana del kéfir tradicional y aislamiento de microorganismos con actividad microbiana*. Trabajo fin de grado. Universidad de Jaén.
- Khan, T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., y Jaspal, H. (2019). "Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge". *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 1-13. DOI: 10.1186/s12944-019-0969-8.
- Liu, J., Chen, M., y Lin, C. (2005). "Antimutagenic and antioxidant properties of milk- kefir and soymilk- kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*", 53(7), 2467-2474. DOI:10.1021/jf048934k.
- Machado de Oliveira, Marco Antonio, M., Raquel, P., Alexandre, R., Joab, S., y Vania Margaret, P. (2013). "Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage". *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341-349. DOI: 10.1590/S1517-83822013000200001.
- Martin Abad, Mª L. (2018). *Utilización biotecnológica de los microorganismos en la elaboración de productos alimentarios*. Trabajo fin de grado. Universidad de Zaragoza.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2019). Informe de consumo alimentario en España. Madrid: MAPAMA.
- Munteanu, G. y Apetrei, C. (2021). "Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. DOI: 10.3390/ijms22073380.
- Pisoschi, M., y Negulescu, P. (2011). "Methods for total antioxidant activity determination: a review". *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 106. DOI: 10.4172/2161-1009.1000106.
- Rea, C., Clayton, E., O'Connor, M., Shanahan, F., Kiely, B., Ross, P., y Hill, C. (2007). "Antimicrobial activity of lacticin 3147 against clinical *Clostridium difficile* strains". *Journal of Medical Microbiology*, 56(7), 940-946. DOI: 10.1099/jmm.0.47085-0.
- Rodríguez, C., Noriega Rodríguez, A., Acuña, A., y Tejeda Mansir, A. (2017). "Avances en el estudio de la bioactividad multifuncional del kéfir. *Interciencia*, 42(6), 347-354.

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33951621003> Consultado el: [3.06.2022].

Rodríguez Figueroa, C., Noriega Rodríguez, A., Lucero Acuña, A., y Tejeda Mansir, A. (2017). "Avances en el estudio de la bioactividad multifuncional del kéfir". *Interciencia*, 42(6), 347-354. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33951621003> Consultado el: [1-03-2022].

Salazar, J., Sánchez, D., y Giraldo. (2019). *Características y beneficios del kéfir como probiótico: Una revisión para el mejoramiento de la salud*. Trabajo fin de grado. Universidad de Pereira.

Sebastián Domingo, J., y Sánchez Sánchez, C.,. (2020)." El Kéfir: Tan Desconocido Como Beneficioso Para La Salud". *Medicina naturista*. 14, (1), 15-17. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/89624?ln=es> Consultado el: [1-03-2022].

Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salehi, M., Bagheri, M., y Sheikhi, A. (2017)." Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties". *Medical Oncology*, 34(11), 1. DOI: 10.1007/s12032-017-1044-9.

Spreer, E., y Torres Quevedo, D. (1991). *Lactología industrial: leche, preparación y elaboración, máquinas, instalaciones y aparatos, productos lácteos*. Zaragoza España: Acribia.

Tamime, Y. (2008). *Fermented milks*. UK: Blackwell Science.

Trum, B. (2004). *Yogur y Kéfir*. EDAF SA.

Vázquez, C., y Koch, A. (2021). "Biotecnología del Kéfir: Una revisión sobre las aplicaciones y sus perspectivas futuras". *Alimentos Ciencia E Ingeniería*, 28(1), 7-33. DOI: 10.31243/aci.v28i1.1042.

Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. (2007). "Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria". *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 106-115. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03072.x.

Yanos, V., Palma, O., Rocío Mendoza, L., y Ruiz, V. (2017). "Beneficios del kéfir para la salud" *Revista Científica de la Investigación y el Conocimiento*, 1(4), 296-311. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7983595> Consultado el: [2-03-2022].

Yilmaz Ersan, L., Ozcan, T., Akpinar Bayizit, A., y Sahin, S. (2016). "The antioxidative capacity of kefir produced from goat milk" *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 7(1), 22. DOI: 10.7763/IJCEA.2016.V7.535.

Yilmaz Ersan, L., Ozcan, T., Akpinar Bayizit, A. y Sahin, S. (2018). "Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefirs". *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3788-3798. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13871>.