

2018

**GRADO EN NUTRICIÓN
HUMANA Y DIETÉTICA**

UTILIZACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LOS MICROORGANISMOS EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS ALIMENTARIOS.

Autora del trabajo: María Luisa Martín Abad
Directora: Dra. Dña. Isabel Otal Gil (Dpto. Microbiología)
Fecha de presentación: Junio 2018

RESUMEN

En la actualidad, la industria alimentaria se ha basado en los procesos de fermentación, éstos proporcionan “nuevos” alimentos con características organolépticas propias. Existen distintos tipos de microorganismos que son utilizados para ello, como las levaduras, las bacterias y los mohos. También pueden considerarse las enzimas de origen microbiano como una buena elección para procesar alimentos y así poder obtener un producto de mayor calidad. En la producción de alimentos por la actividad de éstos microorganismos pueden diferenciarse varios tipos de fermentaciones, como es el caso de la fermentación de la carne para la producción de embutidos y así poder prolongar la vida útil de las carnes; la fermentación de vegetales con la producción de encurtidos, chucrut o cacao; y la fermentación de la leche, con la producción de yogur, quesos o productos lácteos fermentados. Todo esto es debido a las bacterias ácido lácticas, tanto las homofermentativas como las heterofermentativas se les confiere una serie de propiedades beneficiosas para la salud, por lo que son consideradas probióticos. Éstas pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterias* y *Streptococcus* entre otras. Uno de los alimentos que puede considerarse un probiótico natural es el kéfir, se trata de una bebida fermentada con una gran cantidad de microorganismos presentes en él, como las bacterias ácido lácticas y las levaduras presentes en sus granos. Tiene multitud de efectos beneficiosos como pueden ser propiedades anticancerígenas (con la disminución del daño del ADN, disminuyendo el crecimiento tumoral y evitando la proliferación tumoral), antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, hipocolesterolemiantes, y al carecer de lactosa es un producto que pueden consumir los intolerantes a ella.

INDICE

1. INTRODUCCION	2
1.1. Tipos de microorganismos en la industria alimentaria	2
1.2. Ingredientes alimentarios y enzimas de origen microbiano	4
1.2.1. Enzimas	4
1.2.2. Vitaminas	5
1.3. Producción de alimentos por actividad microbiana	5
1.3.1. Fermentación de la carne	6
1.3.2. Fermentación de los vegetales	7
1.3.3. Fermentación de la leche	8
1.3.3.1. Yogur	9
1.3.3.2. Quesos	10
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Composición y aspectos microbiológicos de los granos de kéfir	18
4.1.1. Polisacárido presente en los granos de kéfir	18
4.1.2. Bacterias presentes en los granos de kéfir	20
4.1.3. Levaduras presentes en los granos de kéfir	20
4.2. Distribución de los microorganismos en los granos de kéfir	23
4.2.1. Interacciones entre los microorganismos del kéfir	26
4.3. Conservación de los granos de kéfir	26
4.3.1. Producción de kéfir	27
4.4. Efectos beneficiosos del kéfir	29
4.4.1. Actividad antimicrobiana	29
4.4.2. Actividad antiinflamatoria y curativa	29
4.4.3. Impacto en el tracto gastrointestinal	30
4.4.4. Efectos anticarcinogénicos	30
4.5. Otros efectos beneficiosos del kéfir	34
4.5.1. Efecto antioxidante del kéfir	34

4.5.2. Estimulación del sistema inmune	34
4.5.3. Efecto hipocolesterolémico	34
4.5.4. Kéfir y la intolerancia a la lactosa	35
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	37

ABREVIATURAS

M.O. : MICROORGANISMOS

LAB: BACTERIAS DEL ACIDO LÁCTICO

AAB: BACTERIAS DEL ACIDO ACETICO

PCR-DGGE: ELECTROFORESIS DE GRADIENTE DESNATURALIZANTE

TGI: IMPACTO EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL

PFT: TECNOLOGIA EN LA FERMENTACION DE PROBIOTICOS

ROS: OXIGENO REACTIVO INTRACELULAR

AGS: CELULAS CANCERIGENAS GÁSTRICAS

IG a : INMUNOGLOBULINAS A

BSH: ENZIMA HIROLASA DE SAL BILIAR

LDL: LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD

HDL: LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD

Aw: ACTIVIDAD AGUA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tipos de microorganismos en la industria alimentaria.

En la actualidad, la industria alimentaria se ha basado en los procesos de fermentación, éstos proporcionan “nuevos” alimentos con características organolépticas propias. En el proceso fermentativo un alimento puede convertirse en “utilizable” para aquellos individuos que no toleraban la presencia de algún compuesto determinado en la materia prima original.

El uso de cultivos iniciadores (starters) ha contribuido al desarrollo de una amplia variedad de productos de alta calidad. Un cultivo estárter consiste en una especie o combinación de especies microbianas que una vez adicionados a un producto, originan un conjunto de transformaciones en los componentes básicos (glúcidos–proteínas–lípidos) con un resultado final que se manifiesta en el cambio de la textura, color y flavor del producto final.

Los m.o. utilizados en los procesos fermentativos; levaduras, bacterias y mohos, tienen que:

- Ser capaces de crecer en el sustrato y en ambiente adecuado.
- Sus características metabólicas deben ser constantes a las condiciones de cultivo, para así poder mantener las características organolépticas del nuevo alimento.
- Levaduras→ los diferentes tipos de levaduras se han utilizado en la producción de enzimas, alcohol y otras sustancias. Desde el punto de vista industrial la más importante ha sido la *Saccharomyces cerevisiae*.
- *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura del grupo de los ascomicetos. Este grupo incluye a más de 60000 especies, entre ellas el *Penicillium*. En la naturaleza se encuentra sobre sustratos ricos en azúcares.
El interés alimentario de *Saccharomyces cerevisiae* se debe a la capacidad de dicho organismo de esponjar el pan y por otra parte por el producto final que se obtiene de la fermentación alcohólica (la cerveza y el vino). Estos procesos ocurren debido a la metabolización de los azúcares de la masa o del mosto (esencialmente glucosa, fructosa, sacarosa o maltosa) para generar dióxido de carbono y etanol. El primero es un gas que

provoca que la masa del pan suba (y las burbujas del cava), mientras que el segundo es el origen de las bebidas alcohólicas.

- Bacterias → Entre las bacterias del ácido láctico, siendo la más común *Lactobacillus*, estos forman parte de la microbiota habitual de plantas, animales y alimentos fermentados. (En la figura 1 podemos observar la imagen de *Lactobacillus* en el microscopio). Los procesos fermentativos relacionados con *Lactobacillus* no solamente sirven para conservar los alimentos sino también para la obtención de nuevos productos con propiedades organolépticas determinadas.



Figura 1 Imagen al microscopio de *Lactobacillus*

Fuente: MSD News

- Mohos → la mayoría de los mohos están asociados a la alteración de los alimentos y algunos casos a la formación de micotoxinas. Sin embargo, algunos se utilizan básicamente en la industria alimentaria en la producción de enzimas que se utilizan para la mejora de la calidad de determinados alimentos, como en la industria panadera como (*Aspergillus niger*), (en la figura 2 podemos observar el *Aspergillus Niger* al microscopio) la industria del vino (*Penicillium glaucum*)(en la figura 3 podemos ver el *Penicillium glaucum* en una imagen al microscopio).

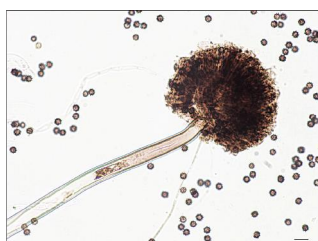


Figura 2: *Aspergillus niger*
Imagen propiedad de " L'Institut national de
Santé Publique Québec

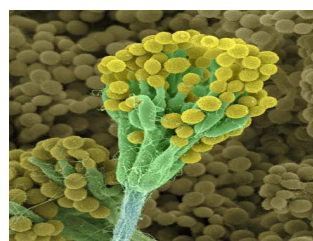


Figura 3: *Penicillium glaucum* Imagen
propiedad del "Musée Armand- Frappier
centre de interprétation des biosciences.

1.2. Ingredientes alimentarios y enzimas de origen microbiano.

Algunos metabolitos microbianos pueden utilizarse como aditivos alimentarios para mejorar el valor nutricional, el sabor, el color y la textura. Algunas de estas sustancias son: proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas, compuestos aromáticos, potenciadores del sabor, endulzantes peptídicos, pigmentos y ácidos orgánicos.

1.2.1. Enzimas

Las enzimas son proteínas encargadas de catalizar reacciones bioquímicas del metabolismo. La utilización de las mismas es la elección más adecuada para procesar alimentos y obtener un producto final de calidad superior. La sustitución de sustancias químicas por enzimas, ofrece a los fabricantes la posibilidad de cumplir con la necesidad de que sus productos sean más seguros en su consumo y tengan la etiqueta de alimentos “limpios”. En la industria de los alimentos y las bebidas, los fabricantes utilizan enzimas como una alternativa “natural” para mejorar la eficiencia en la producción, la calidad y la consistencia del alimento.

Las enzimas añadidas en los alimentos tienen varias aplicaciones:

- Participar activamente en el proceso
 - Directamente → la quimosina (cuajo) para la formación de queso.
 - Indirectamente → pectinasas para clarificar zumos de frutas.
- Modificar la calidad del producto → como las utilizadas en el ablandamiento de la carne, hidrólisis del almidón y la lactosa.
- Preparar ingredientes alimentarios → como jarabes de almidón y dextrosa, para la industria pastelera, del café, té y chocolate.

Se pueden distinguir varias fuentes principales de enzimas en los alimentos:

- Enzimas endógenas del alimento que contribuyen al sabor y aroma.
- Enzimas procedentes de microorganismos deseables que participan en la fabricación de alimentos, así como en la producción de metabolitos responsables del sabor y aroma.
- Enzimas añadidas intencionalmente a los alimentos.

1.2.2. Vitaminas

Los m.o. pueden ser utilizados en la producción comercial de ciertas vitaminas como: La tiamina (B1), la riboflavina (b2) (ésta se sintetiza por muchos microorganismos incluyendo bacterias, levaduras y hongos filamentosos), el ácido pantoténico (B5), la piridoxina (B6), la biotina, el ácido fólico y la vitamina B12 (es sintetizada exclusivamente por los microorganismos, es necesaria y está presente en cada tejido animal, se acumula en el hígado. La producción comercial se lleva a cabo en la actualidad enteramente por síntesis microbiana).

1.3. Producción de alimentos por actividad microbiana.

La producción de los productos fermentados tiene dos aspectos, uno relacionado con la actividad microbiana, y el otro, con los parámetros utilizados durante el proceso y almacenamiento de este producto alimenticio.

La fermentación consiste en exponer las materias primas a unas condiciones tales que favorezcan el metabolismo del microorganismo determinado y deseado. Cuando este m.o. crece, utiliza determinados nutrientes y produce otras sustancias. Estos productos finales del metabolismo y los componentes no metabolizados de las materias primas constituyen el alimento fermentado, que ha adquirido nuevas propiedades organolépticas.

Un alimento fermentado puede ser el resultado de la actividad metabólica de un único m.o. predominante o pueden intervenir varios m.o., tales como diferentes especies y cepas bacterianas. Algunas materias primas contienen m.o. propios, éstos pueden contribuir a determinar las características organolépticas del producto final. Independientemente de los m.o. añadidos para la fermentación.

Los productos pueden ser fermentados por tres vías, según el origen de los m.o. “deseados”.

- ❖ Fermentación natural → algunas materias primas no tratadas térmicamente contiene m.o. deseados, a parte de una microbiota acompañante. En unas determinadas condiciones se favorece el crecimiento de estos m.o. deseados, mientras que la microbiota acompañante no se desarrolla o lo hace lentamente. Un inconveniente es que se pueden desarrollar otros m.o. no deseados, de manera que no se consigue un producto de fermentación o/y pueden crecer m.o. patógenos.

- ❖ Reutilización del producto fermentado.
- ❖ Fermentación controlada → las materias primas se inoculan con un cultivo puro o mixto. Estos m.o. reciben el nombre de cultivos iniciadores, con esta estrategia se consiguen grandes cantidades de producto y con características predecibles.

Los m.o. de uso industrial deben tener una serie de propiedades tales como; no ser patógeno y no generar toxinas, ser genéticamente estable, tener un crecimiento rápido en cultivos de gran escala, fácil reconocimiento de una contaminación, crecimiento en medios de cultivos baratos y fácil recuperación del producto deseado en el medio.

1.3.1. Fermentación de la carne:

En la fermentación de la carne se mezclan la carne, ácidos grasos, sal, azúcar, especias y sustancias que favorecen la curación de la carne, como es el caso de los nitritos.

La fermentación puede ser natural o añadiendo estarters. Los ácidos producidos durante la fermentación y los compuestos que favorecen la curación, ayudan a controlar el crecimiento de m.o. patógenos y m.o. alteradores.

- Embutidos:

Los embutidos son derivados cárnicos alimentarios, preparados total o parcialmente con carnes, u otros subproductos procedentes de animales de abasto u otras especies, especias y aditivos.

Durante la producción de los embutidos intervienen las actividades metabólicas de los m.o. Se pueden diferenciar varios tipos de embutidos en función del tipo de carne de origen y el grado de maduración: Chorizo, salchichón, sobrasada, lomo embuchado, morcón.

Los embutidos pasan por un proceso de fermentación microbiana en el que hay una disminución del pH, y un proceso de desecación para reducir la A_w . La combinación del pH con la reducción de la A_w hace que el embutido tenga una vida útil muy superior que la carne fresca de la que proceden.

Los m.o. desempeñan un papel muy importante en la fabricación de embutidos, ya que están directamente implicados en la reducción de nitratos a nitritos, el descenso del pH y aroma.

Para evitar posibles efectos indeseados en la maduración del producto, se suele inocular la mezcla con cultivos iniciadores para controlar el proceso de fermentación e inhibir el desarrollo de la microbiota acompañante procedente de la materia prima o del proceso de fabricación.

1.3.2. Fermentación de vegetales

La fermentación es una de las formas más antiguas de elaboración y conservación de alimentos en el mundo (Battcock y Azam-Ali, 1998), sobre todo en los países que atraviesan las cuatro estaciones, donde en la época de invierno disminuye la disponibilidad de alimentos. Principalmente se pueden encontrar los encurtidos y los vegetales salinos fermentados, que comprenden diversas especies hortícolas como los pepinillos, pepinos, tomates verdes, col, cebollitas, rabanitos, zanahorias, repollos, berenjenas, remolacha de mesa, judías verdes, pimientos verdes, alcaparra, coliflor, apio y colecitas de Bruselas (Etchells y col, 1968; Baltsouras y col, 1983).

La etapa de fermentación es la operación más importante en todo el proceso de fabricación de vegetales fermentados y consiste en colocar las especies hortícolas en solución salina (salmuera) y dejar que la flora microbiana realice la fermentación natural. Los vegetales deben mantenerse dentro del líquido para prevenir que entren en contacto con el aire y se descompongan por acción de los hongos y levaduras, por lo que en muchos casos puede requerir del uso de un peso (Battcock y Azam-Ali, 1998).

La fermentación ácido-láctica se consigue mediante la combinación de dos factores: la concentración de sal y el descenso del pH de la salmuera debido a la producción de ácido láctico por las bacterias fermentativas. En la preparación de la salmuera se utiliza agua potable, que esté exenta de materia orgánica en suspensión. La sal empleada debe contener menos del 1 % de carbonatos o bicarbonatos de sodio, calcio y magnesio, debido a que estas sales pueden neutralizar el ácido producido por las bacterias que realizan la fermentación (Marteau, 2002). Además, las altas concentraciones de cloruro de sodio impiden el desarrollo de microorganismos perjudiciales y permite la disminución del pH.

El incremento de la acidez en la salmuera se debe a la acción de las bacterias ácido-lácticas, principalmente de la familia *Lactobacillaceae*. Estas transforman por homofermentación la glucosa, las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares

simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico. También se obtiene ácido láctico por heterofermentación, conjuntamente a otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico (Kandler, 1983). En la segunda variante el ácido láctico constituye el 50 % de los productos finales (McDonald y Fleming, 1990; Kandler y Weiss, 1992; Bamforth, 2007).

Son productos de fácil digestión que aportan sabores nuevos.

- Chucrut → resultado de la fermentación láctica de la col en presencia de sal.
La fermentación se produce de manera espontánea, pudiéndose detectar una sucesión de m.o. específicos en cada una de las fases del proceso, como resultado de cambios en las condiciones ecológicas.
- Encurtidos → son productos que después de ser curados en salmuera o de haber sufrido una fermentación láctica se conservan con vinagre y sal. Los alimentos más utilizados son los pepinos, cebollas, pimientos o zanahorias.
- Cacao → Los granos y la pulpa del cacao que se obtienen al abrir las vainas, se someten a una fermentación y un posterior secado. Durante la fermentación existe una sucesión de m.o. en el siguiente orden; levaduras, bacterias del ácido láctico y bacterias del ácido acético. La fermentación microbiana contribuye al sabor, aroma y color. Tradicionalmente la fermentación era natural, sin embargo, para conseguir mejores resultados en la fermentación se inocula las semillas y la pulpa con una mezcla de m.o.: *Saccharomyces chevelieri*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans*. Si la fermentación se inicia con los m.o. deseados, el tiempo de fermentación se reduce y se consiguen las características sensoriales características y específicas del cacao.

1.3.3. Fermentación de la leche:

Los productos derivados de la leche se dividen en dos grupos:

- Fermentados (Yogur) → en éste proceso todos los constituyentes de la leche están presentes en el producto final, con excepción de aquellos metabolizados durante la fermentación.
- Quesos → en éste proceso una proporción significativa de los constituyentes de la leche se eliminan para la obtención del producto final, como el suero.

El crecimiento de los m.o. deseados y la calidad de los productos fermentados dependen de la composición y calidad de la leche utilizada. Los componentes a tener en cuenta son proteínas (caseína), lactosa, lípidos, agua, minerales y alguna traza de vitaminas.

El crecimiento de los m.o. (deseados) puede verse afectados adversamente por componentes naturales presentes en la leche, y por contaminantes. Hay componentes que pueden inhibir al cultivo iniciador, como es el caso de antibióticos utilizados en los piensos o en tratamiento de alguna enfermedad del animal del que procede la leche. Si la leche es tratada térmicamente estas sustancias se eliminan.

1.3.3.1. Yogur

El yogur es un producto fermentado, semisólido debido a la coagulación de la leche por actividad microbiana. Sufre tratamiento térmico para la eliminación de m.o. y desestabilización de la caseína para la formación del gel, aun así para la producción del yogur se le añade un estabilizador, que es el que consigue la textura de gel deseada.

En la figura 4 podemos observar de manera simplificada la producción de yogur partiendo de leche y añadiendo los cultivos iniciadores y los aditivos para conseguir el producto deseado.

Cultivos iniciadores:

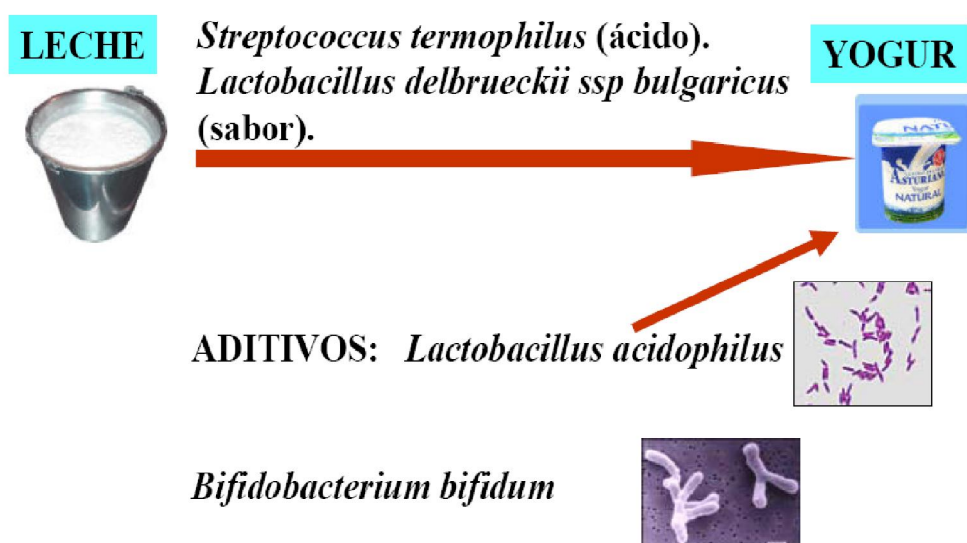


Figura 4 : Producción de yogur partiendo de leche, añadiendo los cultivos iniciadores y los aditivos.

Referente a la normativa del yogur en España nos encontramos con que existen dos posturas bien diferenciadas. La primera de ellas se basa en la consideración del yogur como alimento vivo cuya fermentación láctica se produce por la acción del *Lactobacillus bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*. La segunda posición se fundamenta en la utilización de la denominación "yogur", tanto para el yogur tradicional como para la leche fermentada que ha sufrido un tratamiento térmico.

En la primera de ellas la diferencia con respecto a las leches fermentadas que han sufrido un tratamiento térmico posterior a la fermentación se delimita mediante la utilización de denominaciones como "postre lácteo", "especialidad láctea", "leche fermentada tratada térmicamente", "sobremesa láctea de larga duración", prohibiéndose cualquier referencia a la denominación "yogur". Los que defienden esta postura la fundamentan en el hecho de que la denominación de yogur tratado térmicamente u otra similar no es correcta ni fiable, porque ni técnica ni científicamente es demostrable que dicho producto proceda del yogur, y porque cualquier leche fermentada (con alguna excepción) tratada térmicamente, tendría la misma composición. Es más, incluso manifiestan que podría obtenerse un producto similar sin la previa existencia de microorganismos de ningún tipo, simplemente mediante la adición de ácido láctico.

La segunda posición se fundamenta en la utilización de la denominación "yogur", tanto para el yogur tradicional como para la leche fermentada que ha sufrido un tratamiento térmico. Los países afines a esta postura permiten la utilización de la denominación "yogur" para definir estos nuevos productos: "producto de yogur tratado térmicamente", "yogur pasteurizado después de la fermentación", "yogur de conservación prolongada por acción del calor", "yogur de larga vida", "yogur sometido a tratamiento UHT". Los partidarios de esta posición se basan en el hecho de que los avances tecnológicos en el ámbito alimentario no tienen porqué llevar a un cambio de denominación del producto cuando la composición química del mismo es igual en ambos casos, y tan sólo ha sido sometido a un proceso térmico o químico que le facilita su conservación a temperatura ambiente y lo hacen más duradero. En España está establecida una norma propia relativa al yogur (producto sobre el que no existe una regulación europea): REAL DECRETO 179/2003, de 14 de febrero, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghourt. En esta norma se define como un tipo de yogur al "yogur

pasteurizado después de la fermentación", posicionándonos por tanto dentro del grupo de países de la segunda postura.

1.3.3.2. Quesos

Alimento sólido que se obtiene por maduración de la cuajada de la leche una vez eliminado el suero; sus diferentes variedades dependen del origen de la leche empleada, de los métodos de elaboración seguidos y del grado de madurez alcanzado.

Hay una serie de consecuencias de la adición de LAB, como disminución del pH de la leche, inhibición del desarrollo de otros m.o., secreción de enzimas proteolíticas y lipolíticas, producción de gases (ojos), producción de compuestos aromáticos.

En la figura 5 podemos ver de manera resumida los microorganismos que participan en la elaboración de quesos y leches fermentadas.

Microorganismos que participan en la elaboración de quesos y leches fermentadas

Productos	Microorganismos productores de la acidez	Flora secundaria
Quesos		
Colby, Cheddar, Cottage y tipo cremosos	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> subesp. <i>lactis</i>	Ninguno
Gouda, Edam y Havarti	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> subesp. <i>lactis</i>	<i>Leuconostoc</i> sp. Citrato <i>Lc. lactis</i> subesp. <i>Lactis</i>
Brick y Limburger	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> subesp. <i>lactis</i>	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Micrococcus</i> sp.
Camembert	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> subesp. <i>Lactis</i>	<i>Penicillium camemberti</i> y en ocasiones <i>Brevibacterium linens</i>
Quesos azules, Roquefort	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> subesp. <i>Lactis</i>	Citrato* <i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i> <i>Penicillium roqueforti</i>
Mozarella, Provolone Romano, Parmesano	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb helveticus</i>	Ninguno. Al romano se le añaden lipasas animales para obtener un sabor rancio o picante
Quesos suizos, Gruyere Emmenthal	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lb delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subesp. <i>shermanii</i>
Leches fermentadas		
Yogur	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	Ninguno
Suero de mantequería	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> subesp. <i>lactis</i>	<i>Leuconostoc</i> sp. Citrato, <i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>Lactis</i>
Nata ácida	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> subesp. <i>lactis</i>	Ninguna

Figura 5: Microorganismos presentes en la elaboración de quesos y leches fermentadas.

Fuente: Juan Miguel Rodríguez, Microorganismos y salud, primera edición. Madrid: editorial complutense; diciembre 2006.

En las figuras posteriores podemos observar:

Figura 6. La producción de ácido láctico por bacterias acidolácticas, viendo en cada grupo que parten de la glucosa como sustrato y la producción de ácido láctico y otros componentes. Figuras 7 y 8. Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas tanto homofermentativas como heterofermentativas, y la producción de ácido láctico y otros componentes.

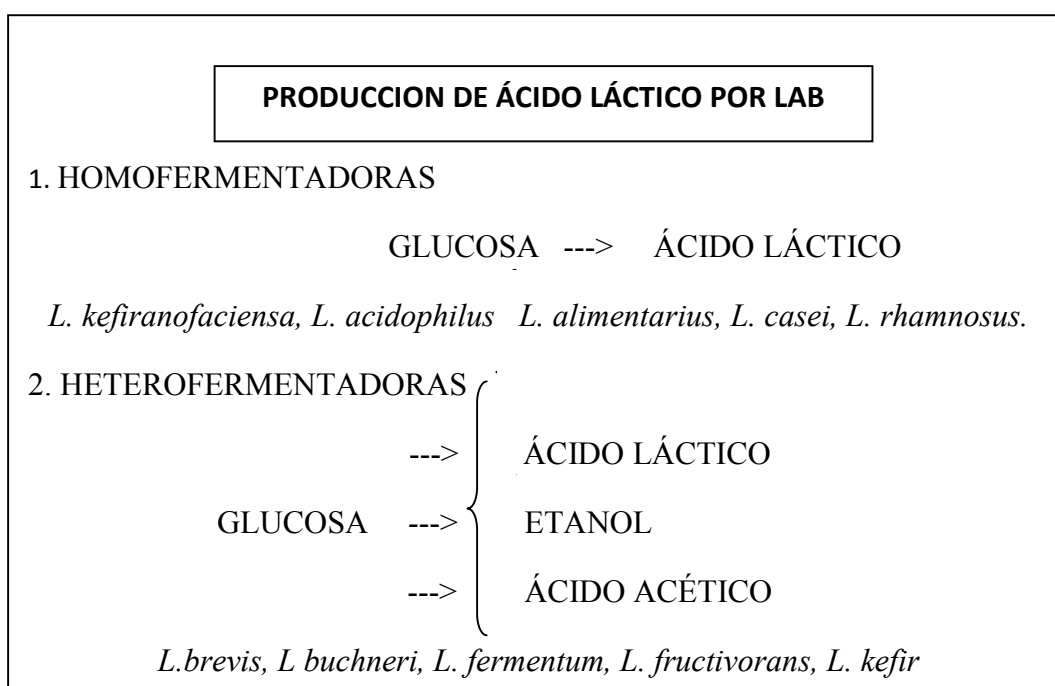


Figura 6: Producción de ácido láctico por bacterias acidolácticas.

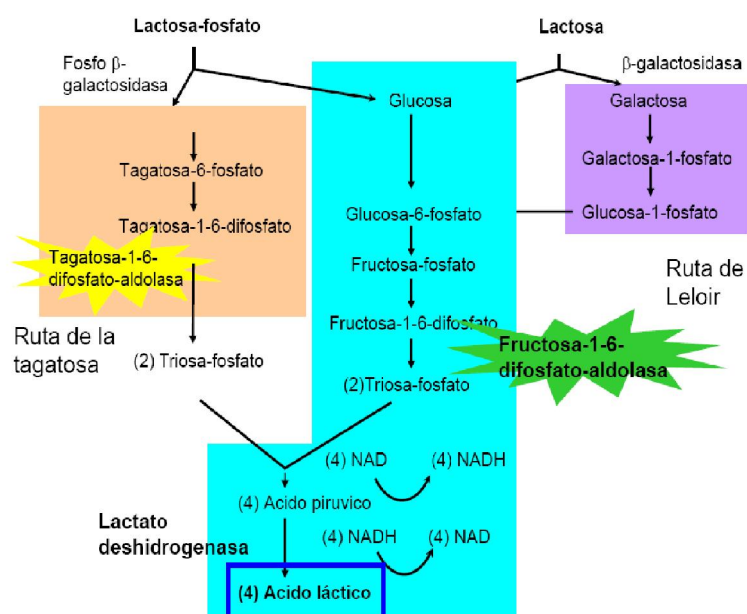
Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas homofermentativas


Figura 7: Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas homofermentativas

Fuente: Juan Miguel Rodríguez, Microorganismos y salud, primera edición. Madrid: editorial complutense; diciembre 2006

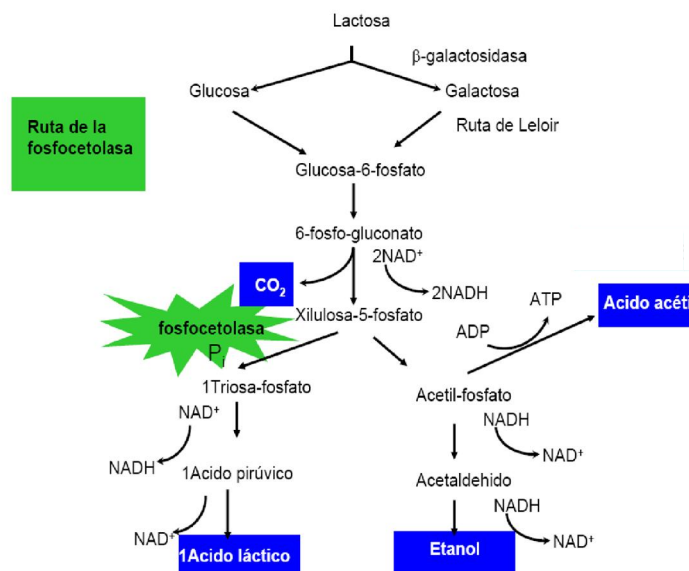
Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas heterofermentativa


Figura 8: Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas heterofermentativas

Fuente: Juan Miguel Rodríguez, Microorganismos y salud, primera edición. Madrid: editorial complutense; diciembre 2006

Las LABs en los diferentes productos lácteos fermentados originalmente se encontraban en la leche al inicial el proceso de fermentación, en la actualidad se deben incorporar después de la pasteurización. Hay dos tipos de Starters, pueden ser naturales o artificiales.

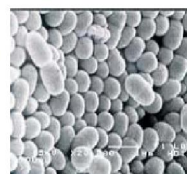
En la figura 9 podemos observar una tabla en la que aparecen los cultivos estarter en LAB homofermentativas, teniendo en cuenta las temperaturas en las que éstos m.o. se desarrollan.

CULTIVOS ESTARTER

Bacterias ácido-lácticas homofermentativas

Mesófilas (25-30°C)

Lactococcus lactis subesp. *lactis* →
Lactococcus lactis subesp. *cremoris*



Termofilas (37°-42°C)

Streptococcus thermophilus →
Lactobacillus delbrueckii subesp. *bulgaricus*
Lactobacillus helveticus

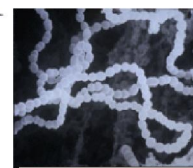


Figura 9. Cultivos estarter en LAB homofermentativas.

Fuente: Juan Miguel Rodriguez, Microorganismos y salud, primera edición. Madrid: editorial complutense; diciembre 2006

Las LABs tienen una propiedad beneficiosa para la salud, por lo que podemos utilizarlas como probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que, ingeridos en determinadas cantidades, produce un efecto beneficioso para la salud del consumidor. La mayoría de los probióticos contiene *Lactobacillus*, *bifidobacterias* y *estreptococos*, y se han utilizado principalmente en el tratamiento de las infecciones gastrointestinales, o como terapia de reposición de la microbiota después de tratamientos prolongados con antibióticos.

Uno de los alimentos que puede considerarse como probiotico es el kéfir.

El Kéfir deriva de la palabra turca keyif, que significa "sentirse bien" después de su ingesta. (Lopitz- Otsoa et al., 2006; Tamime, 2006). Es una bebida de leche fermentada producida por la acción de bacterias y levaduras presentes en los granos de kéfir. La producción artesanal del kéfir se basa en la tradición de los pueblos del Cáucaso, que se ha extendido a otras partes del mundo, desde finales del siglo XIX. Se trata de un producto altamente consumido en Europa del Este, Rusia y Sudoeste de Asia (Tamime, 2006). En la actualidad, se ha informado un aumento en consumo de kéfir en muchos países, debido a sus propiedades sensoriales únicas y larga historia asociada a sus efectos beneficiosos para la salud humana (Farnworth, 2005; Otles y Cagindi, 2003; Tamime, 2006). El Kéfir se caracteriza por su sabor distintivo, típico de levadura, y un efecto efervescente que se siente en la boca (Lopitz- Otsoa et al., 2006; Rattray y O'Connel, 2011). Es considerado un probiótico natural debido a la gran cantidad de microorganismos presentes, las interacciones microbianas, los compuestos bioactivos y los beneficios asociados al consumo de ésta bebida. Varios estudios han demostrado que el kéfir y sus componentes tienen propiedades antimicrobianas, actividad antitumoral, anticancerígena e inmunomoduladora y también mejora la digestión de lactosa, entre otros. (Maria R. Prado et al.2015)

Esta revisión incluye datos sobre los aspectos tecnológicos, los principales efectos beneficiosos sobre la salud humana del kéfir y su composición microbiológica.

2. OBJETIVOS

- Conocer la utilización biotecnológica de los microorganismos en la elaboración de productos alimentarios.
- Analizar los beneficios que pueden aportar los microorganismos para la formación de alimentos y los beneficios para la salud del consumidor.
- Conocer las propiedades beneficiosas del kéfir, analizando su composición y sus propiedades como probiótico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Estrategia de búsqueda

La información recopilada en este documento ha sido extraída de bases de datos científicas con cobertura internacional como: PubMed, Nature, ScienceDirect, scielo, NCBI, US National Library of Medicine, National Institutes of Health, Journal Cambridge University Press, Emeraldinsight, Journal of dairy science.

Palabras clave

Las palabras clave utilizadas para la búsqueda de información fueron:

" microorganisms and food products", " Biotechnological utilization of the microorganisms", "functional foods", " probiotics", "prebiotics", " kefir", " microbial composition", "kefir", " immune regulation kefir", "microbial diversity", "fermented milk", " entre otros.

- Revisar los estudios científicos sobre los microorganismos en productos alimentarios que puedan ser relevantes para el conocimiento en la actualidad, haciendo hincapié en el kéfir y sus efectos beneficiosos.

- Se ha tomado de referencia en la búsqueda de los artículos el rango de años desde el 1990 hasta la actualidad, pudiendo observar cómo han ido evolucionando los diferentes estudios con respecto a la evolución de la industria alimentaria y los estudios sobre probióticos como el kéfir.

4. RESULTADOS

Según la revisión bibliográfica realizada sobre la utilización biotecnológica de los microorganismos en la industria alimentaria, he querido hacer especial hincapié en los probióticos, debido a los numerosos estudios encontrados sobre los probióticos y sus propiedades beneficiosas para la salud, he derivado la búsqueda al kéfir como probiótico, enumerando sus características, los microorganismos presentes en él y sus beneficios para la salud de la persona que consume éste producto. Para la búsqueda he utilizado palabras clave como, " probiotics", "kefir", " kefiran", " microbial composition kefir", en un rango de años comprendido entre el 1990 hasta la actualidad, compaginando los primeros estudios con los más recientes, viendo la evolución que ha seguido.

Los probióticos son microorganismos vivos no patógenos que pueden proporcionar diversos beneficios para la salud del huésped cuando se consumen en cantidades adecuadas. Los probióticos se consumen de diversas maneras, incluidos los productos lácteos, los complementos alimenticios y los alimentos funcionales con declaraciones de propiedades saludables específicas. (Hye-Ji Kang and Sin-Hyeog Im. 2015).

4.1. Composición y aspectos microbiológicos de los granos de kéfir.

Los granos de kéfir están compuestos de microorganismos inmovilizados en una matriz de polisacáridos y proteínas, donde varias especies de bacterias y levaduras conviven en simbiosis (Farnworth y Mainville, 2008; Garrote et al., 2010). En este ecosistema hay un microorganismo relativamente estable que interactúa e influye con otros miembros de la comunidad. Esta población proporciona la síntesis de metabolitos bioactivos, que son esenciales para el crecimiento del grano y la inhibición de microorganismos patógenos y de contaminantes (Garrote et al., 2010).

4.1.1. Polisacarido presente en los granos de kéfir.

El polisacárido presente en el kéfir es el kéfiran. Se trata de un polisacárido ramificado presente en los granos de kéfir (Figura 10, estructura del kéfiran, en la que podemos observar su estructura ramificada) es producido por *L. kefiranofaciens*, es soluble en agua, y contiene

cantidades iguales de D-glucosa y D-galactosa. La producción de este polisacárido se estimula cuando *L. kefiranofaciens* crece en co-cultivo con *S. cerevisiae* (Cheirsilp et al., 2003). Además, tiene una actividad antimicrobiana contra bacterias y *C. albicans* (Rodrigues et al., 2005).

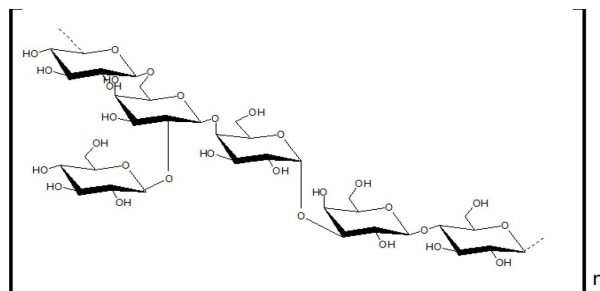


Figura 10: Estructura del kéfiran

Fuente: (Maria R. Prado et al. 2015)

En la tabla posterior podemos observar la actividad biológica del kéfiran, ella hace referencia a los beneficios del kéfir como producto fermentado.

POLISACARIDO	ACTIVIDAD BIOLOGICA	REFERENCIA
KEFIRAN	Reducción de la presión arterial	Maeda et al. 2004
	Favorece la actividad de los macrófagos	Maeda et al. 2004
	Incrementa la Ig A	Duarte et al. 2006
	Actividad antitumoral	Liu et al. 2002
	Actividad antimicrobiana	Rodrigues et al. 2005
	Modulación del sistema inmune y protección de las células epiteliales.	Medrano et al 2008 Piemaria et al 2010

Figura 11 : Actividad biológica del kéfiran.

Fuente: Kéfir : Composición de los microorganismos, actividades biológicas y productos relacionados.
(Lina Marcela Blandón et al. 2015.)

4.1.2. Bacterias presentes en los granos de Kéfir

En el kéfir, las bacterias del ácido láctico son las principales responsables de la conversión de la lactosa en ácido láctico, lo que resulta en una disminución de pH. Otros constituyentes microbianos del kéfir incluyen levaduras fermentadoras de lactosa que producen etanol y CO₂. También se pueden encontrar componentes menores, incluyendo diacetilo, acetaldehído, etilo y aminoácidos contribuyendo a la composición del sabor (Ratnay y O'Connell, 2011).

Hay dos tipos de bacterias presentes en los granos de kéfir:

- LABs Homofermentativas, incluyen especies de *Lactobacillus*, tales como *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens subsp. kefirgranum* y *L. acidophilus*; *Lactococcus spp.* Como *L. lactis subsp. lactis* y *L. lactis subsp. cremoris* y *Streptococcus thermophilus*
- LABs heterofermentativas, incluyendo *L. kefiri*, *L. parakefiri*, *L. fermentum* y *L. brevis* y cepas positivas de citrato *L. lactis* (*L. lactis subsp. L. biovar diacetylactis*), *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, y *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (Leite et al., 2012; Lopitz-Otsoa et al., 2006; Ratnay y O'Connell, 2011).

También participan en el proceso, levaduras no fermentadoras de lactosa y bacterias de ácido acético (AAB) (Magalhães et al., 2011; Ratnay y O'Connell, 2011).

4.1.3. Levaduras presentes en los granos de kéfir.

Las levaduras del kéfir han sido menos estudiadas que las bacterias del mismo, aunque son las encargadas de producir las propiedades sensoriales típicas del mismo (Ratnay) y O'Connell, 2011; Simova et al., 2002).

Las levaduras principales capaces de la fermentación de la lactosa que se encuentran en el kéfir son: *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyr*, *Kluyveromyces lactis var. lactis*, *Debaryomyces hansenii*, también incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia orientalis* y *Debaryomyces occidentalis*.

En los estudios encontrados para realizar ésta revisión se han encontrado datos de microscopía electrónica para conocer la distribución de los microorganismos dentro de los granos de kéfir, éstos mostraron un cambio relativo en su distribución según el origen del grano.

Los granos de kéfir juegan un papel natural en la producción inicial de kéfir y se recuperan después del proceso de fermentación y producción de la bebida fermentada (Rattray y O'Connel, 2011).

Los granos de kéfir varían en tamaño, de 0.3 a 3.0 cm de diámetro (Figura 12 imagen del grano de kéfir), se caracterizan por una forma irregular, presenta una superficie multilobular, unida por una sola sección central, y su color varía de blanco a blanco amarillento. Los granos son elásticos y tienen una textura viscosa y firme (Farnworth y Mainville, 2008; Magalhães et al., 2011; Rea et al., 1996).

La bebida de kéfir en muchos países puede encontrarse comercialmente aunque hay otros países como Brasil que culturalmente son donados.



Figura 12: Estructura al microscopio de los granos de kefir.

Fuente: Analy Machado de Oliveira Leite¹ et al. 2012

Después de la fermentación, los granos aumentan en aproximadamente 5-7% de su biomasa. Durante el crecimiento de los granos de kéfir inmerso en la leche, las proporciones de

microorganismos son diferentes a los presentes en producto final. (Ratray y O'Connel, 2011; Tamime, 2006). Esta diferencia está asociada con las condiciones del proceso de fermentación tales como tiempo de fermentación, temperatura, grado de agitación, proporción de grano / leche y distribución de los microorganismos, entre otros (Ratray y O'Connel, 2011; Simova et al., 2002; Tamime, 2006).

Tradicionalmente, los métodos microbiológicos clásicos son utilizados para estudiar la microbiota del kéfir (Rea et al., 1996; Simova et al., 2002).

Debido a la simbiosis microbiana presente en los granos hay una asociación, entre el crecimiento y la supervivencia de cepas dependiendo de la presencia de cada otro. A menudo, cuando los microorganismos se aíslan de los granos, no crecen bien en la leche y / o muestran una reducción de la actividad bioquímica (Farnworth y Mainville, 2008).

Por lo tanto, los métodos de cultivo independientes han sido utilizados como complemento de los métodos convencionales en el estudio de la microbiota del grano de kéfir. La reacción en cadena de la polimerasa, junto con la electroforesis en gradiente desnaturante (PCR-DGGE) han demostrado ser apropiados para el análisis de complejos los microbianos (Jianzhong et al., 2009; Leite et al., 2012; Magalhães et al., 2010, 2010), mientras que la secuenciación parcial del gen que codifica el ARNr 16S ha sido utilizado para la identificación de especies (Mainville et al., 2006; Ratray y O'Connel, 2011).

Sin embargo, algunos estudios muestran que la técnica PCR-DGGE no permite la detección de cambios significativos durante la fermentación de kéfir (Magalhães et al., 2010), probablemente debido a la estabilidad de la población dominante en esta comunidad. La complejidad de esta comunidad se puede entender mejor mediante la introducción de técnicas de secuenciación masiva, como pirosecuenciación.

Dos estudios, (Dobson et al., 2011; Leite et al., 2012) utilizaron esta técnica para evaluar la diversidad microbiana del kéfir y detectaron la presencia de microorganismos pertenecientes a grupos minoritarios, no reportados previamente, por técnicas de cultivos dependientes o independientes. Además, (Leite et al. 2012), comparando tres granos de kéfir informaron que, aunque los granos sean de orígenes diferentes, ciertos grupos de microorganismos como *Lactobacillus* siempre están presentes en todos los granos lo que contribuye a las características sensoriales presentes en las bebidas fermentadas. (Leite et al., 2012).

También pueden encontrarse una serie de hongos contaminantes como es el caso del *Dipodascus capitatus* y *Trichosporon coremiiforme*, considerados patógenos, que son

identificados por una secuencia de genes en los granos de kéfir (Rattray O'Connel, 2011). También se han descrito algunos contaminantes bacterianos como *Pseudomonas spp.* (Dobson et al., 2011; Jianzhong et al., 2009; Leite et al., 2012) y miembros de las familias *Enterobacteriaceae* y *Clostridiaceae* (Dobson et al., 2011).

La presencia de estos microorganismos puede estar asociados con la contaminación durante una manipulación no adecuada de los granos de kéfir.

4.2. Distribución de microorganismos en granos de kéfir

La distribución de microorganismos dentro de los granos del kéfir se ha estudiado y los resultados son controvertidos.

Un grupo de investigadores apoya la hipótesis de que las levaduras generalmente se encuentran en la zona interna e intermedia del grano, con bacterias en forma de bacilo y lactococos predominantemente en el área superficial (Bottazzi y Bianchi, 1980; Lin et al., 1999).

Por el contrario, otros investigadores describen que las levaduras se distribuyen tanto en áreas externas e internas del grano, la principal diferencia entre las dos áreas son las bacterias en forma de bacilo (Guzel-Seydim et al. 2005; Jianzhong et al., 2009; Magalhães et al., 2011; Rea et al., 1996). Contrario a los resultados reportados previamente (Bottazzi y Bianchi, 1980; Rea et al., 1996), Guzel-Seydim et al. Alabama. (2005) se observó un predominio de bacterias en forma de bacilo, sin ninguna evidencia de levadura en el área interna del grano. Además, algunos autores han informado un menor número de células observadas en la porción de grano interna en comparación con la porción exterior (Jianzhong et al., 2009; Magalhães et al., 2011).

Algunos autores han postulado que el material fibrilar observado en el grano puede ser, de hecho, el polisacárido kefiran presente en todo el grano (Guzel-Seydim et al., 2005; Magalhães et al. 2011).

Otro grupo de investigación también evaluó la distribución de microorganismos de tres granos de kéfir (Figura 13) y observó una variación relativa en su distribución según el origen del grano , en general, las bacterias con forma de bacilo se observaron tanto en el interior (Figura 13 b, d, f) como en las porciones externas del grano (Figura 13 a, c, e), mientras que la presencia de las levaduras es más frecuentes en la porción externa (Figura 13 a, c, e). En toda

probabilidad, el material granular observado correspondió a partículas de leche coagulada adheridas a la superficie del grano y el material fibrilar al polisacárido Kefiran, repartidas en todas las partes de los granos (Guzel-Seydim y otros, 2005; Magalhães et al., 2011; Rea et al., 1996).

Aunque *L. lactis* es uno de los microorganismos predominantes aislado de la bebida de kéfir, varios investigadores (Guzel-Seydim y otros, 2005; Jianzhong et al., 2009; Magalhães et al., 2011) no han observado cocos en micrografías, probablemente debido a una pobre adherencia lactococal a los granos durante el crecimiento, lo que facilitaría la liberación de lactococos en el proceso de lavado (Guzel-Seydim et al., 2005; Jianzhong et al., 2009; Magalhães et al., 2011; Rea et al., 1996). Además, es probable que el pH ácido en el interior del grano interferiría en el crecimiento de este microorganismo en este microambiente particular (Rea et al., 1996). Es probable que los microorganismos superficiales causen mayor impacto en el proceso de fermentación de kéfir (Farnworth y Mainville, 2008). Sin embargo, distintos estudios han demostrado que se produce una amplia variación en la población microbiana entre diferentes granos y dentro del mismo grano.

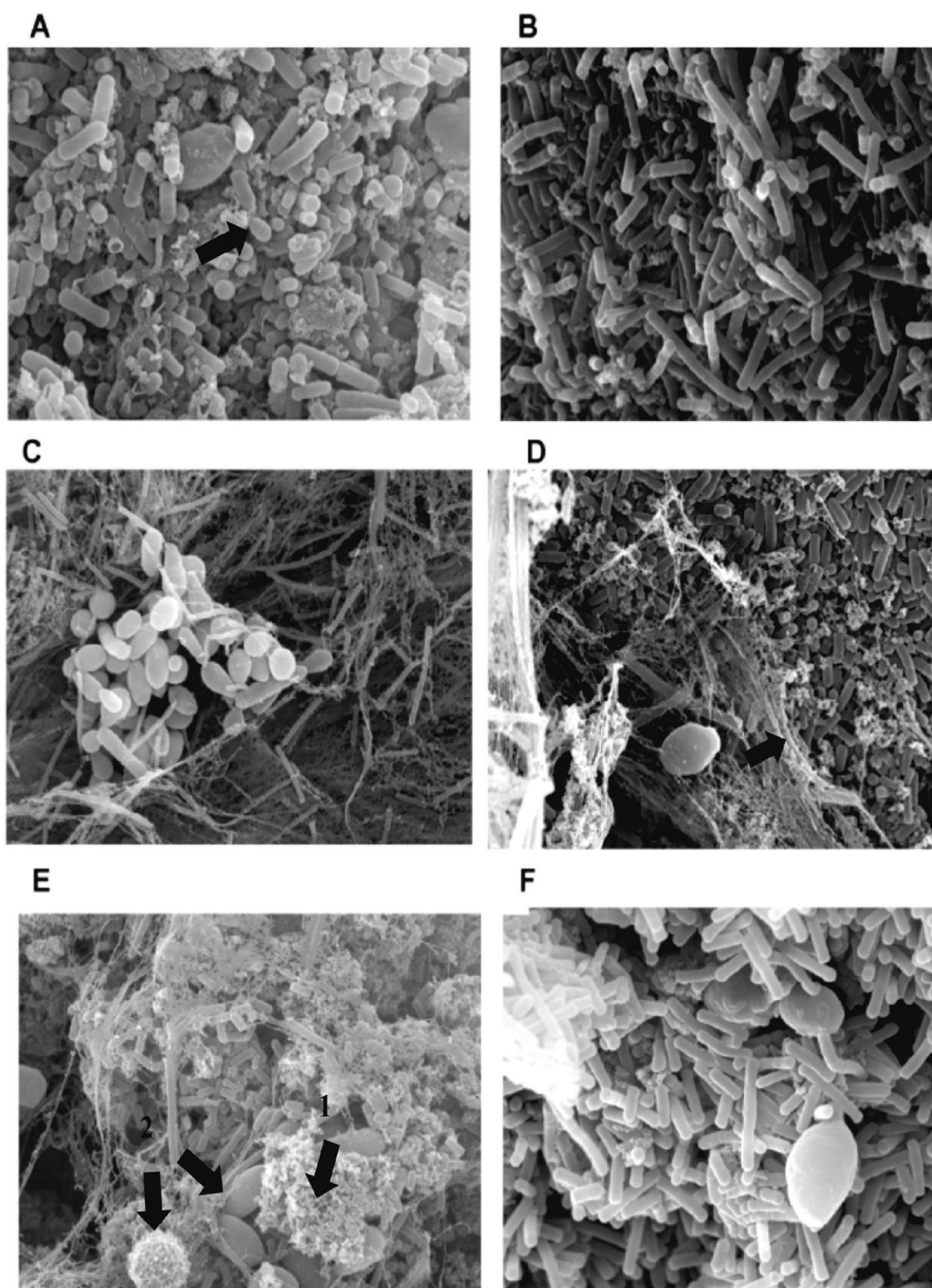


Figura 13 : Microscopía electrónica de barrido de la microbiota del grano de kéfir.

A, C, E: porciones del grano exterior, B, D, F: porciones de grano interno. Flechas - Micrografía A: cocos; Micrografía D: material fibrilar - kefiran polisacárido; Micrografía E: flecha 1- material granular - proteína coagulada, flecha2 - diferentes especies de levadura.

Fuente: (Guzel-Seydim y otros, 2005; Magalhães et al., 2011; Rea et al., 1996).

4.2.1. Interacciones entre los microorganismos del kéfir

Las interacciones entre las levaduras y las bacterias y su interdependencia en los granos de kéfir no están completamente entendidas. Sin embargo, cuando las bacterias están separadas del grano, las levaduras no crecen tan eficientemente (Cheirsilp et al., 2003; Farnworth y Mainville, 2008; Rattray y O'Connel, 2011).

Debido a su gran capacidad para metabolizar la lactosa, el género *Lactococcus* tiende a crecer más rápido (Rea et al., 1996; Tamime, 2006). Este género hidroliza la lactosa, produciendo ácido láctico y un ambiente adecuado para el crecimiento de la levadura (Tamime, 2006). Además, las levaduras sintetizan vitaminas del grupo B complejas e hidrolizan las proteínas de la leche, usando oxígeno para producir CO₂ y etanol (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Tamime, 2006). La interacción entre levadura y bacterias del ácido láctico pueden ser estimuladas o inhibidas por el crecimiento de uno o ambos, en co-cultivos. Estos microorganismos pueden competir por nutrientes para su crecimiento, o producir metabolitos que se inhiban o se estimulan entre sí (Lopitz-Otsoa et al., 2006).

Algunas especies de levaduras son proteolíticas o lipolíticas, que proporcionan aminoácidos y ácidos grasos (Rattray y O'Connel, 2011). Especies como *Debaryomyces hansenii* y *Yarrowia lipolytica* asimilan el ácido láctico formado por LAB, elevando el pH y estimulando el crecimiento de las bacterias. La producción de vitamina B por *Acetobacter* spp. también favorece el crecimiento de otros microorganismos presente en los granos de kéfir (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Rea et al., 1996).

4.3. Conservación de los granos de kéfir.

Durante la fermentación, los granos aumentan de tamaño y número. (Garrote et al., 2010). Si se conservan cuidadosamente, pueden retener su actividad durante años (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Rattray y O'Connel, 2011).

Los granos de kéfir se pueden conservar liofilizados, secos o húmedos (Garrote et al., 2010), pero el lavado constante reduce su viabilidad (Farnworth y Mainville, 2008). Sin embargo, (Pintado, et al. 1996) observaron que los granos almacenados en estas condiciones presentan diferentes perfiles microbiológicos que los frescos. Los granos secos mantienen su actividad

durante 12-18 meses mientras que los granos húmedos mantienen la actividad durante 8-10 días (Garrote et al. al., 2010).

Diferentes métodos de conservación han sido probados (Garrote et al., 1997), siendo la congelación considerada como el mejor método. La liofilización de granos también ha sido probada, pero dio como resultado un metabolismo de lactosa reducido, así como modificaciones en el perfil bacteriano, que era diferente del perfil de grano original (Farnworth y Mainville, 2008).

4.3.1. Producción de kéfir

Hay tres formas principales de producir kéfir

1. El proceso artesanal.
2. El proceso comercial del método ruso.
3. El proceso comercial utilizando cultivos puros.

1. La producción artesanal tradicional, implica la inoculación de leche con una cantidad variable de granos y fermentación durante un período entre 18-24 a 20-25 ° C. Al final del proceso de fermentación, los granos se tamizan y pueden ser utilizado para una nueva fermentación (1-7 días) en leche fresca, mientras que la bebida de kéfir se almacena a 4 ° C, lista para consumo (Beshkova et al., 2002; Farnworth y Mainville, 2008; Otles y Cagindi, 2003). La concentración de inóculo inicial de los granos (proporción grano / leche) afecta al pH, la viscosidad y a la concentración final de la lactosa y del perfil microbiológico del producto (Garrote et al., 1998; Simova et al., 2002). La agitación durante la fermentación también influye en la composición favoreciendo el desarrollo de lactococci y levaduras homofermentativas (Farnworth y Mainville, 2008; Rattray y O'Connel, 2011; Tamime, 2006). La incubación a temperaturas superiores a 30 °C estimula el crecimiento de LAB termófilas, siendo una desventaja para el crecimiento de la levadura y LAB mesófilas (Rattray y O'Connel, 2011).

2. Proceso comercial del "método ruso", permite la producción de kéfir a una escala mayor, y usa un proceso de fermentación en serie, a partir del filtrado resultante desde la primera fermentación de los granos (Farnworth y Mainville, 2008; Rattray y O'Connel, 2011). Se pueden usar diferentes métodos en el proceso industrial de la producción de kéfir, pero todos

basados en el mismo principio. La leche se inocula con cultivos puros aislados de granos de kéfir y cultivos comerciales (Beshkova et al., 2002; Rattray y O'Connel, 2011; Tamime, 2006). En la fase de maduración consiste en manteniendo el kéfir a 8-10 ° C durante un máximo de 24 h (Beshkova et al. al., 2002; Rattray y O'Connel, 2011), para permitir el crecimiento de microorganismos y de levaduras, contribuyendo al sabor específico del producto (Beshkova et al., 2002). La omisión de este paso se asocia con el desarrollo de un sabor atípico del kéfir (Beshkova et al., 2002; Rattray y O'Connel, 2011). Durante el almacenamiento, la producción de CO₂ por levaduras o LAB heterofermentativa puede causar hinchazón en el paquete del producto, un hecho que debe considerarse en la elección de embalaje (Farnworth y Mainville, 2008; Sarkar, 2008). Aunque la bebida comercial está disponible en muchos países, no todas las propiedades del kéfir tradicional están siempre presente (Farnworth y Mainville, 2008; Lopitz- Otsoa et al., 2006).

3. Proceso comercial utilizando cultivos puros permite una producción de kéfir probando varias proporciones de cultivos iniciales (LAB, levadura, AAB), Assadi et al. (2000) descubriendo que el kéfir tradicional producido con granos de kéfir se ha aceptado mejor que el kéfir obtenido mediante el uso del cultivo inicial. Rossi y Gobbetti (1991) produjeron una Bebida tipo "kéfir", con menor viscosidad y ausencia de algunos de los componentes volátiles que a menudo se encuentran en el kéfir. Carneiro (2010), por otro lado, desarrolló un cultivo inicial de microorganismos aislados de los granos del kéfir y el producto fue más aceptado que el tradicional kéfir. Beshkova et al. (2002) propuso dos métodos de fermentación de kéfir: uno por fermentación simultánea y uno por fermentación sucesiva. Por lo tanto, usaron un cultivo inicial que consiste en bacterias y levaduras aisladas de granos de kéfir, combinados a dos variedades comúnmente usadas en la fabricación del yogurt. Las levaduras se agregaron al cultivo inicial con sacarosa, ambas al comienzo (fermentación simultánea) y después del paso de fermentación de ácido láctico. Los dos procesos de fermentación producidos por el kéfir con un alto número de lactococos viables y lactobacilos, con propiedades sensoriales similares a las tradicionales del kéfir. El uso de cultivos comerciales puede estandarizar la producción comercial de kéfir, si la selección de especies y cepas de levaduras y bacterias se llevan a cabo con precisión. Puede permitir una producción de un "kefirtype", se trataría de una bebida con sabor aceptable y buena conservación de sus propiedades (Beshkova et al., 2002; Carneiro, 2010). La bebida comercial puede tener un período de vida comercial de

hasta 28 días, mientras que se recomienda que el kéfir producido con granos se consume entre 3-12 días. Sin embargo, la bebida tipo "kéfir" puede no presentar las mismas propiedades terapéuticas y probióticas presentes en el kéfir (Rattray y O'Connel, 2011).

Las principales deficiencias en la fabricación de kéfir pueden ser atribuido al sabor desagradable y al aroma típico de la levadura (Tamime, 2006). Esto último puede ser causado por un crecimiento rápido de *S. cerevisiae*, acompañado de un aroma típico de vinagre (Tamime, 2006). La producción excesiva de ácido acético también puede influir en el aroma del kéfir, y se produce debido al intenso crecimiento de *Acetobacter spp.* o la presencia de *Dekkera spp.* en los granos. Un sabor amargo puede ser causado por hongos (por ejemplo, *Geotrichum candidum*) y / o por la actividad de algunas levaduras atípicas que pueden estar presentes en el producto (Tamime, 2006).

4.4. Efectos beneficiosos del kéfir

4.4.1. Actividad antimicrobiana

Según los estudios revisados podemos indicar que la actividad antimicrobiana del kéfir se asocia con la producción de ácidos orgánicos, péptidos (bacteriocinas), dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, etanol y diacetilo. (Rattray y O'Connel, 2011). Estos compuestos pueden tener efectos beneficiosos no solo en la reducción de bacterias patógenas durante la producción y el almacenamiento de las mismas, sino también en el tratamiento y prevención de gastroenteritis e infecciones vaginales (Farnworth, 2005; Sarkar, 2007).

En estudios anteriores, Santos et al. (2003) observaron el comportamiento antagónico de lactobacilos aislados de los granos de kéfir contra *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri* y *Y. enterocolitica*.

Posteriormente, Silva et al. (2009) observaron la inhibición de *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. Por otro lado, (Chifiriuc et al. 2011) observó que toda la leche fermentada con granos de kéfir tenía actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* y *S. enteritidis*, pero no inhibió a *P. aeruginosa* y *C. albicans*.

4.4.2. Actividad antiinflamatoria y curativa

Las actividades curativas y antiinflamatorias del kéfir y del kéfirán en ratones se observaron después de un tratamiento de siete días y se corroboró la actividad de curación en quemaduras infectadas con *Pseudomonas aeruginosa*. (Rodrigues et al., 2005) (Diniz et al., 2003).

4.4.3. Impacto en el tracto gastrointestinal (TGI)

La composición de la microbiota puede deberse a una combinación de factores tales como la inhibición directa de patógenos por ácidos y por la producción de bacteriocina, además de la exclusión competitiva de patógenos en la mucosa intestinal (Rattray y O'Connell, 2011).

El consumo de kéfir aumentó significativamente los recuentos de LAB en la mucosa del intestino y poblaciones reducidas de enterobacterias y clostridios. (Marquina et al. (2002).

Además, el consumo de kéfir también impidió la colonización de *C. jejuni* en el sistema digestivo del pollo (Zacconi et al., 2003), y fue efectivo en tratamientos postoperatorios en pacientes con trastornos gastrointestinales (Sarkar, 2007).

En Rusia, el kéfir ha sido utilizado por investigadores en el tratamiento de úlceras pépticas en el estómago y el duodeno de distintos pacientes (Farnworth y Mainville, 2008).

4.4.4. Efectos anticarcinogénicos

El papel anticancerígeno de los productos lácteos fermentados puede atribuirse, en general, a la prevención del cáncer y la supresión de los tumores en estadio temprano, por el retraso de actividades enzimáticas que convierten compuestos procarcinógenos a carcinógenos, o por la activación del sistema inmune (Sarkar, 2007). Kubo et al. (1992) informaron la inhibición de la proliferación de tumores en ratones, (Ehrlich ascites Liu et al. 2002) observando la inhibición del crecimiento tumoral, la inducción de la apoptosis celular en tumores y unos aumentos significativos de los niveles de IgA en ratones, lo que sugiere que el kéfir potencialmente tiene propiedades antitumorales y promueve la resistencia de la mucosa intestinal ante infecciones. (Guven y Gulmez 2003) informaron que los ratones tratados con kéfir tuvieron un mayor efecto protector contra el daño inducido por el tetracloruro de carbono, lo que indica ese kéfir también puede actuar como un antioxidante.

Las investigaciones han concluido que uno de los factores dietéticos importantes son los probióticos como el kéfir para la prevención del cáncer.

Otros estudios sugieren que las bacterias probióticas pueden estimular las funciones efectoras del sistema inmune.

Varios estudios mostraron que el kéfir puede interactuar con varias vías celulares y regular los procesos biológicos, incluyendo el proceso antioxidante, la apoptosis y la proliferación

En el caso del **cáncer de mama** en 2007, Chen et al. realizó un estudio sobre el efecto de los extractos de kéfir en las líneas celulares y demostró que el kéfir deprimía el crecimiento de células de una manera dependiente de la dosis. Los extractos de kéfir inducen la apoptosis, la detención del ciclo celular y reducen el crecimiento tumoral en células de cáncer de mama. (En la Figura 14 podemos observar los mecanismos a través los cuales, el kéfir induce efectos anticancerígenos).

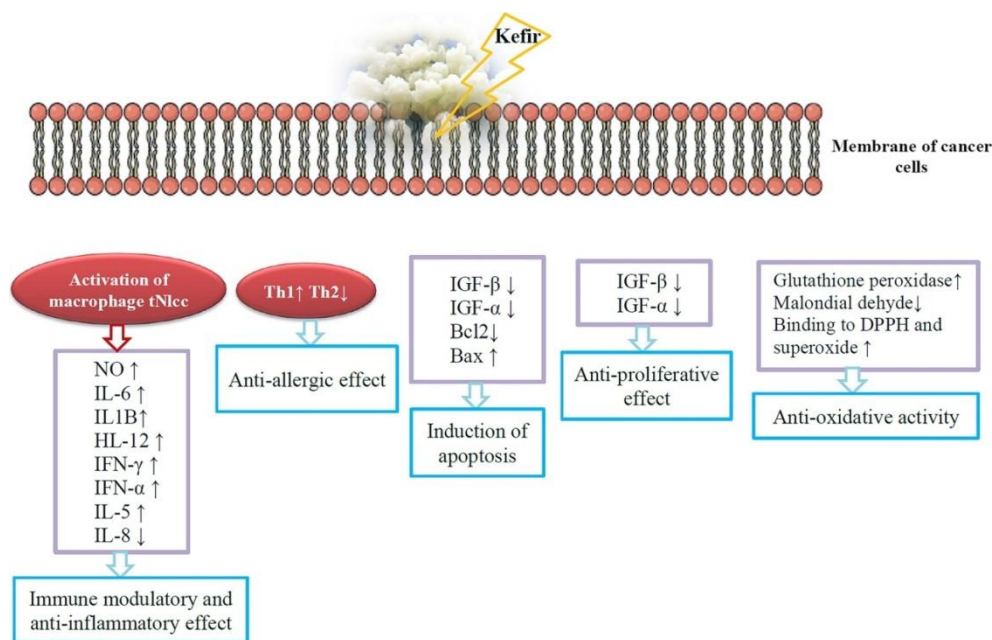


Figura 14: Mecanismos a través de los cuales el kéfir induce efectos anticancerígenos

Fuente: Mohammadreza Sharifi¹ et al. 2017

En la **leucemia**, la ingesta de kéfir ha llevado a un aumento de la apoptosis y una disminución de la proliferación celular. En 2011, Maalouf et al. había demostrado una disminución significativa en la proliferación celular de manera dependiente de la dosis y del tiempo (Jurkat).

Según un estudio sobre los efectos del kéfir sobre las **células cancerosas de la piel**, se ha demostrado que el kéfir suprimía las alteraciones morfológicas en las líneas celulares de melanoma causadas por la radiación UVC. Además, la aplicación del extracto de kéfir después de la irradiación UVC dio como resultado una reducción notable de las especies de oxígeno reactivo intracelular (ROS), aumentada por la exposición a la irradiación UVC. También suprimió la apoptosis y rescató las células de la muerte celular causada por la

irradiación UVC, y concluyó que la aplicación de kéfir puede inhibir el daño de los rayos UV (Sarkar, 2007).

El estudio de la evaluación del efecto de *Lactobacillus kefir*, un producto de kéfir, sobre células de **cáncer gástrico** (AGS) por (Ghoneum y Felo), reveló la inducción de la apoptosis en la línea celular AGS. En 2013, en un estudio de Gao, se evaluó el efecto antiproliferativo del kéfir en la línea celular y se demostró que induce la apoptosis.

Recientemente, se ha recomendado la ingesta productos lácteos fermentados y de sus componentes bacterianos, ya que tienen funciones de promoción de la salud y reducen el riesgo de **cáncer colorrectal**. En un estudio, se ha demostrado que la ingesta de kéfir disminuye significativamente el daño en el ADN y el efecto dependía de la dosis. Los sobrenadantes de kéfir contenían altas cantidades de ácido acético y láctico y mostraron una capacidad antioxidante significativa. La evidencia sugiere que el kéfir pueden disminuir el daño en el ADN, lo que podría deberse a su capacidad antioxidante. Además, informó que el kéfir puede reducir la alteración del sueño en pacientes tratados por cáncer colorrectal (Guyen y Gulmez (2003).

De acuerdo con los estudios previos, las propiedades antitumorales del kéfir se demostraron en diversos tipos de células de **sarcoma**. Los efectos antitumorales del kéfir de leche de soja y el kéfir lácteo por administración oral en células tumorales de ratones portadores con sarcoma, muestran que el crecimiento tumoral se inhibió en un 64.8% en el grupo portador del tumor con leche y en un 70.9% en el grupo de kéfir de leche de soja, comparado con grupo de control. (Cevikbas et al.). Los resultados revelaron los efectos terapéuticos beneficiosos del kéfir en la disminución del tamaño tumoral después del tratamiento con kéfir, en comparación con los controles administrados con solución salina. Los resultados establecieron la eficacia anticancerígena del kéfir y de los productos derivados de él. El producto más eficaz en las células de sarcoma fue el kéfir alcalino.

Según la revisión realizada en éste apartado, hay que destacar que todos ellos han sido estudios realizados in vitro.

En la figura 15 podemos observar de manera sencilla y rápida las propiedades anticancerígenas del kéfir.



Figura 15 : Propiedades anticancerígenas del kéfir

Fuente: Mohammadreza Sharifi1 et al. 2017

Los mecanismos de efecto del kéfir como agente anticancerígeno son los siguientes. Efecto antiinflamatorio e inmunomodulador. La actividad inmunomoduladora de los probióticos también se propuso en diferentes enfermedades. Por ejemplo, la suplementación probiótica podría mejorar y prevenir los síntomas de trastornos autoinmunes.

Sin embargo, no todos los probióticos tienen un efecto positivo idéntico y son bastante diferentes dependiendo de las cepas dentro de la misma especie, la cantidad de dosis y los períodos de tratamiento. (Hye-Ji Kang.2015)

4.5. Otros efectos beneficiosos del kéfir.

4.5.1. Efecto antioxidante del kéfir

La ingesta de kéfir aumenta el nivel de glutatión peroxidasa y disminuye el nivel de malondialdehído, que interviene en el control del estrés oxidativo. Como resultado, el kéfir ejerce un efecto anticancerígeno a través de una propiedad antioxidante y reduce el daño del ADN

4.5.2. Estimulación del sistema inmune

La formación de péptidos bioactivos durante la fermentación o procesos de digestión ha demostrado una variedad de actividades fisiológicas, incluida la estimulación del sistema inmunitario en modelos animales (Farnworth, 2005). Thoreux y Schmucker (2001), después de alimentar ratones con kéfir, se observó un aumento en la respuesta inmune (IgA) contra la toxina del cólera. La estimulación del sistema inmune también puede ocurrir debido a la acción de exopolisacáridos encontrado en los granos de kéfir (Farnworth, 2005; Furukawa et al., 1992). Medrano et al. (2011) observó que el Kéfir era capaz de modificar el equilibrio de las células inmunes en la mucosa del intestino. (Vinderola et al. 2005) demostraron la inmunomodulación como capacidad del kéfir en la respuesta inmune de la mucosa intestinal de los ratones. La administración de kéfir también indujo una respuesta en la mucosa intestinal, lo que sugiere que componentes del kéfir pueden estimular células del sistema inmune innato, suprimiendo la respuesta inmune de Th2 fenotipo o promover respuestas inmunes mediadas por células contra tumores e infecciones por patógenos intracelulares (Liu et al. al., 2002). Recientemente, Hong et al. (2009) demostraron, in vitro, la capacidad inmunomoduladora de LAB aisladas de granos de kéfir, sugiriendo su influencia en la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- por TLR-2.

4.5.3. Efecto hipocolesterolémico

Posibles mecanismos propuestos para la actividad hipocolesterolemizante en LAB puede implicar la inhibición de la absorción de colesterol en el intestino delgado (Wang et al., 2009).

Wang et al. (2009) observó una reducción significativa en los niveles séricos de colesterol total, en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en triglicéridos, mientras que no había cambios en los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) en ratones alimentados con una dieta rica en colesterol complementada con *Lactobacillus plantarum*. Por otra parte, el colesterol total y los triglicéridos en el hígado también se redujeron, aumentando significativamente el colesterol y los triglicéridos en las heces. Anteriormente ya se había realizado otro estudio (Liu et al., 2006) en el que se había observado una reducción de los niveles séricos de triglicéridos y de colesterol, especialmente la fracción no HDL.

4.5.4. Kéfir y la intolerancia a la lactosa

La capacidad de disminuir las concentraciones de lactosa y la presencia de actividad de galactosidasa en leche en los productos fermentados, los hacen adecuados para el consumo de las personas clasificados como intolerantes a la lactosa (Farnworth y Mainville, 2008; Sarkar, 2007). Se ha demostrado que algunos de los granos de kefir muestran la actividad de la enzima galactosidasa, que se mantiene activa cuando se consume, y ese kéfir contiene menos lactosa que la leche (Farnworth, 2005; Sarkar, 2007). (Hertzler y Clancy, 2003). Demostraron que un kéfir comercial puede ser tan eficaz como yogur en la reducción de hidrógeno expirado y flatulencia en adultos intolerantes a la lactosa en comparación con la ingestión de leche. Vrese et al. (1992) demostró que los cerdos alimentados con kéfir mostraron un aumento significativo en concentraciones plasmáticas de galactosa, lo que sugiere una mejoría de la hidrólisis de lactosa intestinal por la enzima microbiana galactosidasa.

5. CONCLUSIONES

- Numerosos estudios verifican los efectos benéficos de los probióticos para mantener nuestro cuerpo en un buen estado de salud. El kéfir al ser un probiótico refiere los beneficios propios de los mismos.
- Según la revisión bibliográfica de la composición de los granos de kéfir se ha observado que comparando tres granos de orígenes diferentes los *Lactobacillus* siempre están presentes en todos los granos, contribuyendo a las características sensoriales del producto.
- En el área interna del grano se han observado un predominio de bacterias, sin evidencia de levaduras.
- Se ha observado que el mejor método de conservación de los granos de kéfir es la congelación.
- El kéfir entre sus efectos beneficiosos incluye propiedades anticancerígenas disminuyendo el crecimiento tumoral, disminuyendo la apoptosis y mejorando la respuesta inmune.
- Se han observado que el kéfir reduce los niveles séricos de colesterol total, en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en triglicéridos, mientras que no había cambio en los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL).
- El kéfir se trata de una bebida fermentada sin lactosa debido a la actividad enzimática que disminuye la lactosa y por tanto es un producto adecuado para los intolerantes a la lactosa.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Aristo V., Mamdooh G., Paul C.. Minimizing Cancer Risk Using Molecular Techniques. (1997)
2. Assadi MM, Pourahmad R, Moazami N Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World J Microbiol Biotechnol.*(2000). 16:541-543.
3. Beshkova D, Simova ED, Simov ZI, Frengova GI, Spasov Z N Pure cultures for making kefir. *Food Microbiol* (2002) 19:537-544.
4. Bottazzi V, Bianchi F A Note on Scanning Electron Microscopy of Micro-organisms associated with the Kefir Granule. *J Appl Microbiol* (1980) 48:265-268.
5. Berlanga M. Unidad 4. Utilizacion biotecnologica de los microorganismos en la elaboracion de productos alimentarios. SEM (sociedad española de microbiologia). (2008). Universidad de Barcelona.
6. Cevikbas,A.,Yemni,E.,Ezzedenn,F.W.,Yardimici,T.,Cevikbas,U.,andStohs,S.J. Antitumoural, antibacterial and antifungal activities of kefirand kefir grain. *Phytother.Res.* (1994). 8, 78–82.doi:10.1002/ptr.2650080205
7. Cheirsilp,B., and Radchabut,S. Use of whey lactose from dairy industry for economical kefir production by *Lactobacilluskefirifaciens* in mixed cultures with yeasts. *N. Biotechnol.*(2011).28, 574–580.doi:10.1016/j.nbt.2011.0 1.009
8. Cheirsilp B, Shimizu H, Shioya S Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol* (2003)100:43-53.
9. Chen,H.C., Wang,S.Y., and Chen,M.J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture -dependentand culture- independent methods. *FoodMicrobiol.* (2008). 25, 492–501.doi:10.1016/j.fm.2008.0 1.003
10. Chen, Y.P., Hsiao, P.J. , Hong, W.S., Dai, T.Y., and Chen, M.J. *Lactobacillus kefirifaciens* isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis in vitro and in vivo. *J. DairySci.* (2012). 95, 63–74.doi: 10.3168/jds.2011-4696
11. Chen,Z., Shi,J., Yang,X., Nan,B. ,Liu,Y., and Wang,Z. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *Int. DairyJ.* (2015). 43, 15–21.doi:10.1016/j.idairyj.2014.10.004

12. Diniz, R., Garla, L., Schneedorf, J., and Carvalho, J. C. Study of anti- inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacol. (2003). Res.* 47, 49–52. doi: 10.1016/S1043-6618(02)00240-2
13. Diniz RO, Perazzo FF, Carvalho JCT, Schneenedorf JM Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. *Rev Bras Farmacogn* (2003) 13:19-21.
14. Dobson,A., O’Sullivan,O., Cotter,P.D., Ross,P., and Hill,C.. High- through put sequence-basedanalysis of the bacterial composition of kefirand an associated kefirgrain. *FEMSMicrobiol. (2011)Lett.* 320, 56–62.doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02290.x
15. Duarte, J., Vinderola, G., Ritz, B., Perdigon, G., and Matar, C.. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology* (2006) 211, 341–350. doi: 10.1016/j.imbio.2005.12.002
16. Farnworth, E.R..Kefir–acomplexprobiotic. *Food Sci.Technol.Bull.Funct. Foods* 2, 1–17. (2005) doi:10.1616/1476-2137.13938
17. Farnworth,E.R., and Mainville,I. “Kefir: a fermented milk product ,”in *Hand book of Fermented Functional Foods*, ed.E.R.Farnworth (BocaRaton,FL: CRCPress), (2003). 77–112.
18. Furukawa N, Liyama R, Takahashi T, Yamanka Y The effect of oral administration of water soluble fraction from kefir grain on antibody production in mice. *Anim Sci Technol* (1992) 63:428-436.
19. Gao,J., Gu,F., Ruan,H. ,Chen,Q .,He,J., and He,G..Induction of apoptosis of gastric cancer cellsSGC7901invitrobyacell-free fraction of Tibetan kefir. *Int. DairyJ.* (2013) 30, 14–18.doi:10.1016/j.idairyj.2012.11.011
20. Garrote GL, Abraham AG, De Antoni G Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. *Lebensm-Wiss u-Technol* (1997) 30:77-84.
21. Garrote GL, Abraham AG, De Antoni G Characteristics of kefir prepared with different grain:milk ratios. *J Dairy Res* (1998) 65:149-154.
22. Garrote,G.L. ,Abraham,A.G. ,and De Antoni,G.L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J. DairyRes.* (2001). 68, 639–652.doi: 10.1017/S0022029901005210

23. Garrote, G.L., Abraham, A.G., and De Antoni, G.L. "Microbial Interaction sin Kefir: a Natural Probiotic Drink," in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, eds F. Mozzi, R.R. Raya, and G.M. Vignolo (Ames, IO: Wiley-Blackwell), (2010) 327–340.
24. Garrote GL, Abraham AG, De Antoni G Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In F. Mozzi, R. R. Raya & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Novel Applications* (2010) pp. 327-340. Iowa: Blackwell Publishing.
25. Guven A, Gulmez M The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride- induced mice tissues. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* (2003) 50:412-416.
26. Guzel-Seydim Z, Wyffels JT, Seydim AC, Greene AK Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. *Int J Dairy Technol* (2005) 58:25-29.
27. Guzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K., and Ta, T. Determination of antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids. *Int. J. Dairy Technol.* (2006). 59, 209–215. doi: 10.1111/j.1471-0307.2006.00265.x
28. Guzel-Seydim, Z., Wyels, J. T., Seydim, A. C., and Greene, A. K. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. *Int. J. Dairy Technol.* (2005). 58, 25–29. doi: 10.1111/j.1471-0307.2005.00177.x
29. Hamet, M.F., Londero, A., Medrano, M., Vercammen, E., VanHoorde, K., Garrote, G.L., et al. Application of culture – dependent and culture – independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food Microbiol.* (2013) 36, 327–334. doi: 10.1016/j.fm.2013.06.022
30. Hertzler SR, Clancy SM Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose *maldigestion*. *J Am Diet Assoc* (2003) 103:582-587.
31. Hye-Ji Kang and Sin-Hyeog Im Probiotics as an Immune Modulator *J Nutr Sci Vitaminol*, (2015). 61, S103–S105,
32. Jianzhong, Z., Xiaoli, L., Hanhu, J., and Mingsheng, D.. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.*

- (2009)26, 770–775. doi: 10.1016/j.fm.2009.04.009
33. Kubo M, Odani T, Nakamura S, Tokumaru S, Matsuda H Pharmacological study on kefir—a fermented milk product in Caucasus. I. On antitumor activity. *Yakugaku Zasshi* (1992) 112:489-495
34. Leite, A. M. O., Mayoa, B., Rachid, C. T., Peixoto, R. S., Silva, J. T., Paschoalin, V. M., et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiol.* (2012). 31, 215– 221. doi: 10.1016/j.fm.2012.03.011
35. Leite, A. M. O., Miguel, M. A., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., and Paschoalin, V. M. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz. J. Microbiol.* (2013). 44, 341–349. doi: 10.1590/S1517-83822013000200001
36. Lin CW, Chen HL, Liu JR Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwann. *Aust Journal of Dairy Tech* (1999) 54:14-18.
37. Liu,J.R., Wang,S.Y., Lin,Y.Y. ,and Lin,C.W. Antitumoractivity of milk, kefir and soya milk kefir intumor bearingmice. *Nutr. Cancer* (2002). 44, 183–187.doi: 10.1207/S15327914NC4402_10
38. Liu JR, Wang SY, Lin YY, Lin CW Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *NutrCancer*(2002) 44:183-187.
39. Liu JR, Wang SY, Chen MJ, Chen HL, Yueh PY, Lin CW Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilkkefir in cholesterol-fed hamsters. *Br J Nutr* (2006) 95:939-946.
40. Lopitz,F.O., Rementeria,A., Elguezabal,N., and Garaizar,J..Kefir: una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras con propiedades saludables. *Rev.Iberoam.Micol.* (2006) 23, 67–74.doi:10.1016/S1130-1406(06)70 016-X
41. Maeda,H.,Zhu,X.,Suzuki,S.,Suzuki,K.,andKitamura,SStructural characterization and biological activities of a nexopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacilluskefirano*faciens WT-2B(T). *J. Agric.FoodChem.* .(2004).52, 5533–5538.doi:10.1021/jf049617g

42. Magalhães KT, Pereira GVM, Dias DR, Schwan RF Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J Microbiol Biotechnol* (2010)26:1241-1250.
43. Magalhães KT, Pereira MA, Nicolau A, Dragone G, Domingues L, Teixeira JA, Silva JBA, Schwan RF Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresour Technol* (2010) 101:8843-8850.
44. Magalhães, K.T., Pereira, G.V.M., Campos, C.R., Dragone, G., and Schwan, R.F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Braz.J.Microbiol.* (2011). 42, 693–702.doi:10.1590/S1517- 838220110002000034
45. Mainville I, Robert N, Lee B, Farnworth ER Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Syst Appl Microbiol*(2006) 29:59-68.
46. Marquina D, Santos A, Corpas I, Munoz J, Zazo J, Peinado JM Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. *Lett Appl Microbiol* (2002) 35:136-140.
47. Medrano, M., Pérez, P.F., and Abraham, A.G..Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *Int.J.FoodMicrobiol.* (2008) 122, 1–7.doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.046
48. Medrano M, Racedo SM, Rolny IS, Abraham A a G, Perez PF Oral Administration of Kefiran Induces Changes in the Balance of Immune Cells in a Murine Model. *J Agric Food Chem* (2011) 59:5299-5304.
49. Mohammadreza S., Abbas M., Deniz M., Mahsa S., Marzieh B., Abdolkarim S. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties.*Med Oncol* (2017) 34:183 DOI 10.1007/s12032-017-1044-9.
50. Ozyurt VH, Ötles S. Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* (2014):413-424. doi: 10.17306/J.AFS.2014.4.8.
51. Philippe R M. Michael de Vrese Christophe J Cellier Jürgen S. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics *The American Journal of Clinical Nutrition*, (February 2001). Volume 73, Issue 2, 1, Pages 430s–436s, <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.430s> Published:01
52. Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M. A., and Abraham, A. G. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and

- mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/ FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocoll.* (2010). 25, 1261–1269. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.11.024
53. Rattray FP, O'Connell MJ Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2th ed). Academic Press , San Diego, USA, (2011) p.518-524
 54. Rea MC, Lennartsson T, Dillon P, Drina FD, Reville WJ, Heapes M, Cogan TM Irish kefir-like grains : their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *J Appl Microbiol*(1996) 8:83-94.
 55. Rodrigues KL, Caputo LR, Carvalho JC, Evangelista J, Schneedorf JM Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents* (2005) 25:404-408.
 56. Rodrigues,K.L.,Caputo,L.R.G.,Carvalho,J.C.T.,Evangelista,J.,andSchneedorf, J.M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int. J.Antimicrob.Agents* (2005).25, 404–408.doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020
 57. Rodrigues,K.L.,Carvalho,J.C.T.,andSchneedorf,J.MAnti-inflammatory properties of kefir polysaccharide extract. *Inflammopharmacology* .(2005).13, 485–492.doi:10.1163/156856005774649395
 58. Prado R., Blandón L.M., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., Castro G.R., Thomaz-Soccol, V. and Soccol Milk kefir C.Rcomposition, microbial cultures, biological activities ,and related products. .:(30 October 2015) doi: 10.3389/fmicb.2015.01177.
 59. Sarkar S. Potential of kefir as a dietetic beverage - a review. *Br Food J* (2007) 109:280-290.
 60. Sarkar S Biotechnological innovations in kefir production: a review. *Br. Food* (2008) J 110:283-295.
 61. Simova,E.,Beshkova,D.,Angelov,A.,Hristozova,T.,Frengova,G.,and Spasov,Z. Lactic acid bacteria and yeast in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind.Microbiol.Biotechnol.*(2002).. 28, 1–6.doi:10.1038/sj.jim.70.00186.
 62. Tamime AY Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime, AY (ed.), *Fermented Milk* Blackwell Science Ltd , Oxford, UK, (2006) p.174-216.
 63. Thoreux K, Schmucker DL Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *J Nutr* (2001) 131:807-812.

64. Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigon G, Farnworth E, Matar C Immunomodulating capacity of kefir. *J Dairy Res* (2005) 72:195-202.
65. Vinderola,G.,Perdigon,G.,Duarte,J.,Farnworth,E.,andMatar,CEffects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immunestimulation. *J. DairyRes.* .(2006).73, 472–479.doi: 10.1017/S002202990600197X
66. Wang, S. Y., Chen, K. N., Lo, Y. M., Chiang, M. L., Chen, H. C., Liu, J. R., et al. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiol.* (2012). 32, 274–285. doi: 10.1016/j.fm.2012.07.001
67. Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., and Song, S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranoferiens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *Int. J. Biol. Macromol.* (2008). 43, 283–288. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011
68. Zacconi C, Scolari G, Vescovo M, Sarra PG Competitive exclusion of *Campylobacter jejuni* by kefir fermented milk. *Ann Microbiol*(2003) 53:179-187.