

## **BIOTECNOLOGÍA DEL KÉFIR: UNA REVISIÓN SOBRE LAS APLICACIONES Y SUS PERSPECTIVAS FUTURAS**

Mauro Cadme<sup>1</sup> Alma Koch<sup>1</sup>  
mecadme@espe.edu.ec, arkoch@espe.edu.ec  
Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE<sup>1</sup>

Recibido: 06 de febrero de 2021

Aceptado: 05 de junio de 2021

### **Abstract**

Kefir has been widely used throughout human history, involving centuries of heritage. Nowadays, the applications of this drink are directly related to human health, besides, polymers have been developed and their applications are still being researched. This review article aims to make a journey between the applications that have been given to this drink and the future prospects.

In recent decades, consumer demands in the food production have changed considerably. Consumers increasingly believe that food contributes directly to their health (Mollet & Rowland, 2002). Today, food is not only intended to satisfy hunger and provide the necessary nutrients for humans, but also to prevent nutrition-related diseases and improve the physical and mental well-being of them (Menrad, 2003; Roberfroid, 2000a). In this regard, functional foods play an important role. The growing demand for such foods can be explained by the increasing cost of health care, the steady increase in life expectancy, and the desire of older people to improve the quality of their last years (Kotilainen et al., 2006; Roberfroid, 2000a, 2000b).

The great consumer acceptance, high health costs, the need to improve the quality of life, delay the aging process, industrial growth and the development of new products make kefir a very promising product.

**Keywords: Lactic Acid Bacteria (LAB), fermentation, antioxidative activity, recombination.**

## **1. Introducción**

Los alimentos funcionales son productos enriquecidos con componentes especiales que poseen efectos fisiológicos ventajosos (Hardy, 2000; Kwak & Jukes, 2001; Stanton et al., 2005). Los alimentos funcionales pueden mejorar las condiciones generales del cuerpo, disminuir el riesgo de algunas enfermedades e incluso usarse como tratamiento (Açik et al., 2020; Ahmed et al., 2013; Vinderola, Duarte, Than-gavel, Perdigon, et al., 2005).

El uso de los probióticos y prebióticos es conocido por la humanidad desde hace siglos y la búsqueda de sus beneficios para la salud está aumentando gracias a las investigaciones centradas en diversos productos alimenticios. Los investigadores tienen un creciente interés en los probióticos de los productos lácteos fermentados (Garrote et al., 2010; Prado et al., 2015). Las investigaciones recientes se concentran en las interacciones entre el huésped y la microbiota, los mecanismos de acción y de desintoxicación que pueden influir en el sistema inmunológico del ser humano o animal (Zajšek & Goršek, 2010).

El kéfir forma parte de los alimentos funcionales de interés actual, su estudio se enfoca en los beneficios en el cuerpo humano así como en la industria (Kim et al., 2019). Al ser el kéfir un tema de actualidad, se desarrolla una investigación profunda de los usos tradicionales, así como de los modernos, mediante biotecnología e ingeniería genética.

### **1. Kéfir: historia en la humanidad**

El kéfir es una antigua bebida de leche fermentada originaria del Cáucaso (Margulis et al., 1997). Se utiliza am-

pliamente para la nutrición humana debido a sus propiedades saludables. Tradicionalmente, la bebida se produce mediante la fermentación de la leche con granos de kéfir, formados por una mezcla de microorganismos (Aryana & Olson, 2017). La mayoría pertenecen al grupo de las bacterias del ácido láctico, pero también contiene levaduras y bacterias del ácido acético (Garrote et al., 2010; Lopitz-Otsoa et al., 2006). Dependiendo de su edad, la bebida resultante es típicamente ácida, de sabor fuerte y parcialmente viscosa (Kabak & Dobson, 2011).

El kéfir es una bebida estimulante y gaseosa tradicionalmente producida a través de la fermentación de diferentes tipos de leche como la de oveja, vaca y cabra, entre otras. Sin embargo, actualmente se han propuesto bebidas alternativas al kéfir, sustituyendo a la leche y aplicando otras fuentes de carbohidratos, como jugos de frutas y melaza (Harta et al., 2004).

El kéfir, tanto de leche como de agua, es obtenido a partir de los granos de kéfir, que tienen una forma similar a la de la coliflor. Son elásticos, irregulares, gelatinosos, de color marfil o blanco y de tamaño variable, entre 0-3 a 3-5 cm de diámetro (Garrote et al., 2010; Gaware et al., 2011). En general, el grano de kéfir se compone de 4,4% de grasa, 12,1% de ceniza, 45,7% de mucopolisacáridos, 34,3% de proteína total (27% insoluble, 1,6% soluble y 5,6% de aminoácidos libres), vitaminas B y K, triptófano, Ca, P y Mg (Marshall & Cole, 1985). Los granos de kéfir pueden conservarse liofilizados, secos o húmedos; conservando sus propiedades nutricionales (Garrote et al., 2010).

### **Microorganismos del kéfir**

La distribución del kéfir es global y, como tal, existen diferencias entre cada grano de kéfir. En la tabla 1 se muestra los microorganismos prevalentes de acuerdo a la región o país. Los análisis moleculares y el estudio filogenético (Dobson et al., 2011; Gondaliya et al., 2021), han facilitado el trabajo en la identificación de los microorganismos presentes y la relación genética entre ellos.

### **Producción**

Hay tres formas principales de producir kéfir: (I) el proceso artesanal, (II) el proceso comercial por el método Ruso y (III) el proceso comercial utilizando cultivos puros (Farnworth, 2005; Otlis & Cagindi, 2003; Rattray & O'Connell, 2011), como se muestra en la Fig.1. Además de leche vaca, se pueden utilizar otros sustratos. Estos incluyen: zumos de fruta, soluciones de azúcar o melaza, leche de otras especies animales, leche de coco y leche de soja, entre otros (Caiza, 2019; Harta et al., 2004; Hsieh et al., 2012; Matos et al., 2020).

El método tradicional para elaborar la bebida fermentada se produce añadiendo directamente granos de kéfir al sustrato. La leche cruda se hierve y se enfría a 20-25°C y se inocula con 2-10% de granos de kéfir, respecto a la masa de leche. Después de un período de fermentación, de 18 a 24 h a 20-25°C, los granos se separan del fermentado por filtración con un tamiz, pueden secarse a temperatura ambiente y mantenerse a temperatura fría para ser utilizados en la siguiente inoculación (O'Brien et al., 2016; Sarkar, 2008).

En el proceso industrial del kéfir, el primer paso es homogeneizar la leche, seguido de pasteurización a 72°C por 15 s. Luego se enfría a 18-24°C y se inocula con granos de

kéfir del 2-8% en tanques de fermentación. El tiempo de fermentación varía de 18 a 24 h. Se separa el inóculo del líquido y se distribuye en botellas. Después de madurar a 12-14°C durante 24 h y se almacena a 4°C (Kotova et al., 2016; Wszolek et al., 2007).

El uso de cultivos comerciales puede normalizar la producción comercial de kéfir, si la selección de especies y cepas de levaduras y bacterias se lleva a cabo con precisión y cuidado, permitiendo así la producción de una bebida "tipo kéfir" con un sabor aceptable y buenas propiedades de conservación (Simova et al., 2002; Sulistyaningtyas et al., 2019). Sin embargo, es posible que la bebida no presente las mismas propiedades terapéuticas y probióticas presentes en el kéfir tradicional (Rattray & O'Connell, 2011).

### **Métodos de Caracterización**

- Químicos

Para la caracterización química del kéfir comúnmente se utiliza: análisis de acidez (pH y % de ácido láctico), el contenido total de materia seca, grasa, proteínas y cenizas (Laureys & De Vuyst, 2014; Magalhães et al., 2010).

- Bioquímicos

La producción de metabolitos en la fermentación del sustrato por parte de los granos de kéfir comúnmente se estudia mediante el análisis de fermentación de azúcares (Garrote et al., 2001).

- Moleculares

Con el avance del entendimiento de las técnicas moleculares, cada vez es más fácil la caracterización de los microorganismos presentes en el kéfir. Actualmente se utiliza: pirosecuenciación de 16S RNA, pirosecuenciación del genoma completo

(Dobson et al., 2011; Korsak et al., 2015; Nalbantoglu et al., 2014; Zamberi, Mohamad, et al., 2016), análisis de huella genómica (GTG)5-REP-PCR (Gao & Zhang, 2018), análisis mediante DGGE-PCR (H. C. Chen et al., 2008; Garofalo et al., 2015; Kotova et al., 2016). El uso de técnicas moleculares brinda un resultado preciso de la composición microbiana en la bebida.

- Filogenéticos

Conocer la biología evolutiva de los microorganismos presentes en el kéfir facilita el estudio de las relaciones entre la microbiota presente, y así identificar los microorganismos que proporcionan los beneficios a la bebida (Burcu & Alper, 2013). La principal herramienta empleada para este fin es la construcción de árboles filogenéticos basados en las secuencias del gen 16S rRNA (Burcu & Alper, 2013; Gondaliya et al., 2021; Mogheth & El Gendy, 2017).

### **Proceso de fermentación**

En el inicio de la fermentación, el contenido de sustrato corresponde a cerca del 80% del volumen total. Se compone de aproximadamente 90% de sacarosa, 6% de azúcares reductores y 1,5% de minerales, como K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Mn, Zn y Cu (Guerra & Mujica, 2010). El etanol es el principal bioproducto del proceso de fermentación. Su concentración aumenta de forma lineal alcanzando valores superiores al 10% del volumen total (Satir & Guzel-Seydim, 2016). Además, se encuentra ácido láctico, ácido acético, manitol, glicerol, ésteres y otros ácidos orgánicos (Laureys & De Vuyst, 2014). También es una fuente importante de Ca, Mg, P y principalmente Zn (Oliveira et al., 2019). Durante la fermentación del kéfir existe

una simbiosis entre bacterias ácido lácticas y levaduras. La hidrólisis de la sacarosa por la invertasa de la levadura resulta en un aumento de los niveles de glucosa y fructosa, haciendo disponible la fuente de carbono para las LAB y favoreciendo su crecimiento (Magalhães et al., 2010).

### **Producción de metabolitos**

En diferentes estudios de los metabolitos producidos por el kéfir, se han encontrado aminoácidos, péptidos y análogos de los péptidos, hidratos de carbono y conjugados de hidratos de carbono, flavonoides y glucósidos de flavonoides, isoflavonas y glucósidos de isoflavonoides, glicerofosfolípidos y glucósidos de terpeno (Azi et al., 2020; Laureys et al., 2019).

Dentro de los metabolitos de mayor importancia presentes en el kéfir está el Kefiran: Exopolisacárido (EPS) del kéfir (Tan et al., 2020), del cual se hablará con mayor detalle más adelante.

## **2. Kéfir: Beneficios en la salud**

### **Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante del kéfir está estrechamente relacionada con la mitigación de las especies reactivas de oxígeno y la presencia de enzimas antioxidantes como se ilustra en la Fig. 2. Esta actividad se ha estudiado mediante los métodos de eliminación de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), inhibición de la auto oxidación del ascorbato, ensayo de citotoxicidad, poder reductor, eliminación superóxido y de la inhibición de la peroxidación de los lípidos (Alsayadi et al., 2013; Dume & Sánchez, 2019; J. R. Liu et al., 2005; Tang et al., 2018).

Los efectos antioxidantes han sido analizados en diferentes sustratos como el agua

azucarada (Alsayadi et al., 2013), las leches de vaca y cabra (J. R. Liu et al., 2005; Yilmaz-Ersan et al., 2016), leche de soya (Kesenkaş et al., 2011) y extracto de arroz (leche de arroz) (Sirirat & Jelena, 2010). Además, se realizaron ensayos utilizando cultivos *Lb. plantarum* (Tang et al., 2018).

Se ha determinado que los efectos antioxidantes se deben a la presencia de enzimas antioxidantes intracelulares y sustancias no enzimáticas (Lin & Yen, 1999). Esta actividad se atribuye a la capacidad de donación de protones del kéfir, su poder reductor y la actividad similar a la Superóxido Dismutasa (Kesenkaş et al., 2011; J. R. Liu et al., 2005). Adicionalmente, se sugiere que la acción antioxidante se incrementa por la presencia de macromoléculas en el sustrato, ya sean proteínas lácteas (J. R. Liu et al., 2005; Smet et al., 2008; Yilmaz-Ersan et al., 2016) o compuestos fenólicos (Kesenkaş et al., 2011; Sirirat & Jelena, 2010).

Al adicionar extractos de plantas, la actividad antioxidante aumenta significativamente; se ha utilizado extractos de romero en leche de burra (Perna et al., 2019), extracto de lentejas en leche de vaca (Gunenc et al., 2017) y extractos de canela o jengibre en leche de cabra. Se observa un aumento del 12,4% de la actividad antioxidante cuando se agrega una solución de canela (Setiyoningrum et al., 2019).

La eliminación de radicales libres aumenta de inmediato después de añadir los granos de kéfir al sustrato. Sin embargo, a mayor tiempo de fermentación, mayor acción (Tang et al., 2018; Yilmaz-Ersan et al., 2016).

#### **Actividad Antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana se ha probado en

enteritidis (Jeong et al., 2017), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* (Sirirat & Jelena, 2010) *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* (Santos et al., 2003) *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Cronobacter sakazakii* (Kim et al., 2016). Incluso se ha evaluado la actividad antibiótica en cepas resistentes como *S. aureus* resistente a metilina (Marques et al., 2020).

Para evaluar la antibiosis del kéfir, se utiliza el método de la difusión de discos (Santos et al., 2003; Sirirat & Jelena, 2010; Ulusoy et al., 2007), mediante medios enriquecidos con soluciones de kéfir (Kim et al., 2016; Marques et al., 2020; Sulmiyati et al., 2019) y haciendo uso de EPS disuelto en el medio de cultivo (Jeong et al., 2017).

La capacidad antifúngica se ha estudiado en *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula glutinis* y *Torulopsis glabrata* (Cevikbas et al., 1994) y *Aspergillus flavus* (Gamba et al., 2016).

La actividad antifúngica se la analiza mediante el crecimiento de las cepas de levaduras en tubos con medio enriquecido y solución de kéfir y se evalúa su presencia o ausencia de crecimiento (Cevikbas et al., 1994). Un proceso alternativo es el uso de cajas Petri con medio enriquecido con soluciones de kéfir (Gamba et al., 2016).

Se ha encontrado que la familia *Lactobacillaceae* es en parte responsable de la actividad antimicrobiana

(Marques et al., 2020) cuyo efecto se debe a la producción de bacteriocinas (Atanassova et al., 1999), además de la inhibición competitiva de la adhesión de enteropatógenos a las células epiteliales (Santos et al., 2003). Se sugiere que el efecto bactericida, al igual que el fungicida del kéfir, en conjunto con lo antes mencionado, se debe a la presencia de ácidos orgánicos, etanol y diacetilo (Gamba et al., 2016; Kim et al., 2016; Sirirat & Jelena, 2010).

Actualmente, Hamida et al. (2021) plantean que el kéfir como bebida de suplemento diario puede contrarrestar las infecciones virales debido a la presencia de LAB. Se ha probado la efectividad de cepas aisladas contra: Herpes simplex virus (Cavicchioli et al., 2018), Rotaviruses (Olaya et al., 2016), Enteroviruses (Sunmola et al., 2019) y Noroviruses (Aboubakr et al., 2014).

Un posible mecanismo de acción del kéfir contra la infección viral combina la estimulación en la producción de citoquinas, así como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), la interleucina (IL)-2 y la IL-12; con la inhibición de la respuesta inflamatoria al suprimir la producción de citoquinas, IL-6, la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  (Hamida et al., 2021). Se muestra en la Fig.3 la acción antimicrobiana y antiviral del kéfir.

### **Actividad Anticancerígena**

La relación del kéfir y el cáncer ha abarcado diferentes estudios enfocados en la actividad antiinflamatoria (Moreira et al., 2008), antitumoral (Liu et al., 2002), inhibición del crecimiento de tumores (de Moreno de LeBlanc et al., 2006) y acción protectora de tejidos (El Golli-Bennour et al., 2019; Nagira et al., 1999). Para efectuar dichos estudios, se han utilizado líneas celulares

(Cevikbas et al., 1994; Hatmal et al., 2018; Wei-sheng Hong et al., 2009), modelos animales (Moreira et al., 2008; Vinderola, Duarte, Thangavel, Perdígón, et al., 2005) y ensayos en humanos (Topuz et al., 2008).

Se descubrió que el kéfir inhibe la proliferación de las células cancerosas mediante la detención del ciclo celular y la inducción de la apoptosis a través de la regulación al alza de Bax y a la baja de Bcl-2 (Badr El-Din et al., 2020; Gao et al., 2013). Aparentemente, el principal polisacárido del kéfir, el kefiran, es el responsable de las propiedades antitumorales, debido a su capacidad para proteger las proteínas del daño oxidativo de los sistemas 2,2'-azobis(2-aminopropano) dihidrocloruro (AAPH) y Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chen et al., 2015). Además, el kéfir promueve la secreción de citoquinas que evitan la proliferación de células cancerosas (Wei-sheng Hong et al., 2009; Tellez et al., 2010), por las levaduras presentes (Smith et al., 2014). Las propiedades anticancerígenas son mayores a tiempos de cultivo menores, estos resultados son coherentes con la producción inicial de metabolitos bioactivos citotóxicos (Hatmal et al., 2018). Los mecanismos de inducción de estos efectos se muestran en la Fig. 4.

El efecto anticancerígeno del kéfir de leche puede dirigirse a todo el cuerpo, ya que su consumo regular influye tanto en el tracto gastrointestinal (Can et al., 2009; Khoury et al., 2014; Topuz et al., 2008) como en las mamas (de Moreno de LeBlanc et al., 2006; Zamberi, et al., 2016), los pulmones (Tung et al., 2020; Vinderola et al., 2005) y piel (Nagira et al., 1999). Este efecto beneficioso puede ser el resultado de la mejora de la microbiota intestinal y del sistema inmunitario asociado

al mayor consumo de compuestos bioactivos producidos por el kéfir (Lim et al., 2017; Rafie et al., 2015).

### **Enfermedades metabólicas**

Se ha estudiado al kéfir como suplemento que permite una mejoría en la obesidad (Lim et al., 2017; Tung et al., 2020). Se ha demostrado que la administración de LAB, aisladas del grano de kéfir puede acelerar la pérdida de peso, mejorar las características de la salud en condiciones de obesidad y la esteatosis hepática en obesos preexistentes (Kim et al., 2015). Se muestra aceleración de la pérdida de peso, la modulación metabólica y el metabolismo lipídico hepático mediante la intervención de LAB en combinación con la dieta (Chen et al., 2018). Se ha demostrado la capacidad del kéfir de inhibir la diferenciación de los adipocitos (Ho et al., 2013) mediante la disminución de la expresión en los genes relacionados a la adipogénesis (Choi et al., 2017) proceso por el cual la grasa se acumula en las células.

Estudios demuestran que el consumo diario de kéfir y de sus productos puede dar lugar a una hipocolesterolemia significativa (Huang et al., 2013). El efecto en la baja del colesterol se atribuye a los microorganismos y compuestos biogénicos derivados de la bebida (Rocha-Gomes et al., 2018; Xiao et al., 2003). Se sugiere, que uno de los efectos del kéfir en el tracto gastrointestinal implica la vía del metabolismo endógeno del colesterol, asegurando su asimilación y metabolización por los microorganismos, inhibiendo la absorción del colesterol en el intestino delgado (St-Onge et al., 2000; Vujičić et al., 1992; Wang et al., 2009; Yusuf et al., 2020). Además, hay datos que sugieren que el kéfir puede

oponerse a la hipercolesterolemia mediante 1) la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa, enzima clave de la síntesis del colesterol (Prado et al., 2015; Wang et al., 2009) y 2) la desconjugación de las sales biliares, aumentando la demanda de colesterol para la síntesis de novo (Wang et al., 2009; Yusuf et al., 2020).

El efecto protector del kéfir contra el hígado graso se ha estudiado en modelos animales. Se demuestra que el consumo de kéfir atenúa el aumento de la masa corporal y los contenidos séricos de glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) y glutamato piruvato transaminasa (GPT) (Chen et al., 2016). Este efecto se produce a través de la inhibición de la vía de la lipogénesis hepática en lugar de la promoción de la utilización de los lípidos (Chen et al., 2014; Kim et al., 2017).

Se han evaluado los efectos antidiabéticos del kéfir en modelos murinos (Ghazi Mahdi AL-Shemmari et al., 2018; Tiss et al., 2020) y en pruebas con humanos (Alihosseini et al., 2017; Ostadrahimi et al., 2015). Los resultados en las pruebas en pacientes muestran una disminución no significativa de azúcar en suero y de hemoglobina glicosilada (HbA1C) (Ostadrahimi et al., 2015), una disminución no significativa de la insulina en suero y una disminución significativa de la resistencia a insulina evaluada por modelo de homeostasis (HOMA-IR) (Alihosseini et al., 2017). En las pruebas en modelos murinos los resultados indican una disminución de la glucosa en suero (Ghazi Mahdi AL-Shemmari et al., 2018), explicada por la actividad de las LAB en la bebida (Honda et al., 2012). Tiss et al. (2020) mediante la administración de kéfir a base de leche de soya, demostraron la

reducción de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en el intestino y páncreas, consecuentemente disminuyó el azúcar en sangre.

#### **Otros efectos en la salud humana**

Los efectos contra la hipertensión de la leche fermentada con granos de kéfir y sus microorganismos derivados o compuestos biogénicos se han demostrado en modelos experimentales de hipertensión arterial (Amorim et al., 2019; Kanbak et al., 2014; Yap et al., 2016). Este efecto está asociado a 35 péptidos con potencial actividad hipotensiva debido a la inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE) (Amorim et al., 2019).

Se ha evidenciado la actividad antialérgica del kéfir ya que, *Lactobacillus kefirifaciens* y *Lb. kefir*, estimulan la producción de IFN- $\gamma$  e IL-12 in vitro tanto en macrófagos peritoneales como en esplenocitos (Davras et al., 2018; Fujiwara et al., 2004; Hong et al., 2010). Se sabe que la IL-12 desempeña un papel fundamental al inducir una respuesta inmunitaria dominante Th1 y potenciar la inmunidad celular (Shida et al., 1998). El IFN- $\gamma$ , secretado por las células Th1, es un antagonista del IL-4 e inhibe la producción de IgE presente ante alérgenos (Davras et al., 2018).

El kéfir ha sido estudiado para determinar su acción en el sistema óseo. Las investigaciones se han desarrollado en modelos murinos y se ha concluido que tiene un beneficio en enfermedades óseas (Chen et al., 2014; Tu et al., 2020). Los resultados indican el aumento de la densidad mineral ósea trabecular (DMO), el volumen óseo (VB/TV), el grosor trabecular (Tb. Th), el número trabecular (Tb. N) y las propiedades biomecánicas del fémur distal. Estos beneficios pueden deberse al incremento de la

absorción de calcio a través del canal de calcio TRPV6 (Tu et al., 2015).

### **3. Aplicaciones biotecnológicas**

#### **Elaboración de alimentos fermentados**

El kéfir se ha utilizado como cultivo iniciador en la producción de vinagre de manzana (Viana et al., 2017), masa madre para la producción de pan (Harta et al., 2004; Limbad et al., 2020; Plessas et al., 2005), bebidas de fruta fermentadas (Corona et al., 2016; Koh et al., 2018; Matos et al., 2020; Nogueira et al., 2016; Zongo et al., 2020) y harina fermentada (de Souza et al., 2020). El EPS del kéfir (Costa et al., 2010; Rehman et al., 2018) y kéfir liofilizado (Katechaki et al., 2008; Mei et al., 2014) han sido empleados en la elaboración de diferentes tipos de queso.

Al evaluar la calidad del pan, se consiguió una buena fermentación, mejor sabor y frescura durante más tiempo (Harta et al., 2004; Limbad et al., 2020). La vida útil del pan se duplicó, explicado por el aumento del pH y la posible presencia de bacteriocinas (Plessas et al., 2007); sin embargo, se recomienda estudios microbiológicos para determinar las propiedades antimicrobianas del pan.

En la producción de queso mozzarella haciendo uso del EPS, se observa una mejor masticación y dureza, mientras un impacto leve en la resiliencia, la cohesión y la elasticidad. Al mismo tiempo, mejoró la elasticidad, la capacidad de fundirse y la pérdida de grasa en comparación con el proceso tradicional (Rehman et al., 2018). Estas propiedades se las atribuye al EPS, reportadas de forma similar en la elaboración de queso cheddar (Costa et al., 2010). Cuando se utiliza el kéfir liofilizado para la elaboración de queso duro, se



observa una mejoría significativa de las características de aroma, sabor y textura y un aumento del grado de apertura en comparación el método convencional (Katechaki et al., 2008). En el queso Camembert se observa aumento de la vida útil y la seguridad microbiana, mejor textura y perfil sensorial (Mei et al., 2014), explicado todo por la presencia de LAB (Leroy & De Vuyst, 2004).

Con el fin de mejorar la calidad en los productos alimenticios, la fermentación juega un papel importante ya que proporciona metabolitos con propiedades funcionales (Stanton et al., 2005). Para este fin, se ha elaborado harina fermentada de la raíz de *Marranta arundinacea* usando los granos de kéfir. El proceso permitió reducir la concentración de carbohidratos, produciendo ácidos orgánicos y promoviendo un aumento de los compuestos fenólicos. También se comprobó que la capacidad antioxidante es elevada, lo que indica un aumento de su valor nutricional (de Souza et al., 2020).

### **Producción de vino**

La fermentación alcohólica y maloláctica de zumo de manzana y uva usando kéfir como cultivo iniciador ha sido estudiada por Anastasios Nikolaou y su equipo de trabajo. Se demuestra que el cultivo de kéfir es adecuado para la fermentación alcohólica y maloláctica simultánea de vino en un amplio rango de temperaturas. Se indica aceptación durante la evaluación sensorial preliminar y niveles bajos de alcoholes diferentes al etanol, implicando productos de alta calidad. Sin embargo, proponen investigaciones relacionadas con el mantenimiento de la viabilidad de las células cuando se interrumpe la producción de vino, con el fin de ajustarse a las necesidades industriales y

comerciales (Nikolaou et al., 2017, 2019; Nikolaou et al., 2020a; Nikolaou et al., 2020b; Nikolaou et al., 2020c). En la Fig.5 se resumen las aplicaciones del kéfir.

### **Mejorando el rendimiento del kéfir**

En el proceso de mejorar las características del kéfir, se ha ensayado cambiar el pH del sustrato (Arévalo & Quispe, 2008; Laureys et al., 2019), modificar la temperatura (Putri et al., 2020), la presión (Ribeiro et al., 2020), la concentración inicial del inóculo (Apar et al., 2017), evaluar la presencia de CO<sub>2</sub> (Kök-Taş et al., 2013), usar fermentación secundaria (Yıldız-Akgül et al., 2018) e incluso, añadir extractos de plantas en búsqueda de mayores beneficios (Aiello et al., 2020).

Al evaluar el efecto del pH en la producción del kéfir, se observa que los cambios en el pH óptimo (4,4) generan un decremento en el crecimiento de la biomasa (Arévalo & Quispe, 2008). Cuando existe amortiguación del pH se presentan altas concentraciones de carbohidratos totales residuales y bajas concentraciones de metabolitos. Además, se evidencia altas proporciones de LAB con respecto a las levaduras, lo que refleja altas proporciones de ácido láctico y ácido acético con respecto al etanol (Laureys et al., 2019). Estas condiciones que permiten una proliferación de las LAB pueden ser usadas cuando se requiera de sus características.

En la producción de EPS, se ha demostrado que la adición de 10% de CO<sub>2</sub> genera un aumento significativo del producto; además se reportó un crecimiento favorable de *Bifidobacterium spp* y *Lactobacillus acidophilus* (Kök-Taş et al., 2013).

En busca de un aumento de los beneficios del kéfir, se probó el uso de una segunda fermentación del mismo utilizando microorganismos termófilos, mesófilos, levaduras y cultivos probióticos. En términos generales, el uso de la fermentación secundaria, adicionalmente a los granos de kéfir, produjo mejores resultados que el método tradicional (sólo con granos de kéfir) en términos de propiedades microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales (Yıldız-Akgül et al., 2018).

La temperatura juega un papel importante en el proceso de fermentación del kéfir para la producción de metabolitos (Putri et al., 2020); se demostró que la temperatura óptima para el crecimiento de la biomasa del kéfir es de 27°C (Apar et al., 2017; Barão et al., 2019). En el estudio de Apar et al. (2017) se evidencia que la concentración de inóculo de kéfir que mejores resultados provee es el 5% w/w con respecto al sustrato en la temperatura mencionada.

Aiello et al. (2020) en su trabajo recopilan los beneficios de las plantas sobre el kéfir. El valor agregado brindado permite un aumento en la actividad antioxidante (Chen et al., 2018; Gunenc et al., 2017; Perna et al., 2019; Setiyoningrum et al., 2019), así como en la evaluación sensorial (Kabakci et al., 2020; Nogueira et al., 2016).

Se ha buscado mejorar la producción de los granos de kéfir utilizando fermentadores de dos etapas. Los resultados, indican un aumento de más de cinco veces el volumen de producción al compararla con la fermentación de una sola etapa, estos datos implican una mejoría tanto tecnológica como económica (Goršek & Tramšek, 2008).

### **Modificación genética para mejorar las características del kéfir**

No se han encontrado investigaciones donde se modifique las características del kéfir mediante tecnología genética. Sin embargo, se han realizado cambios genéticos en microorganismos que se encuentran en el kéfir. A continuación, se muestran estudios con mejoras de interés para el kéfir, con perspectivas a utilizar estas cepas modificadas para incrementar los beneficios en la producción y consumo.

*Lactobacillus casei*, bacteria del ácido láctico presente en el kéfir, ha sido modificada mediante tecnología de plásmidos. Se usó el vector pVE3874 para expresar el gen *sodA* de *Lactococcus lactis*. Como resultado *Lb. casei* adquirió una actividad eficiente de superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) por lo que esta cepa se administró a ratones como tratamiento de la colitis (Watterlot et al., 2010).

Haciendo uso de la tecnología de enzimas de restricción *SmaI/EcoRV* y *BamHI/Xho*, el gen *OmpAI* fue insertado en el genoma de *Lb. casei*; la cepa modificada se utilizó para inmunizar peces contra *Aeromonas veronii* y los resultados indicaron mayor actividad de lisozima, ácido fosfatasa y superóxido dismutasa (Zhang et al., 2018).

Mediante el plásmido pCYT, el gen HSP65-6P277 fue insertado en *L. lactis*. La cepa fue administrada en ratones para demostrar la disminución de la incidencia de diabetes mellitus tipo 1. Se obtuvieron resultados positivos en el tratamiento, explicados por el alza de la respuesta inmune tipo Th-2 (Ma et al., 2014)

En *Kluyveromyces marxianus*, levadura no convencional, se ha utilizado la ingeniería genética para mejorar la expresión de las enzimas lignocelulolíticas, optimizando

el promotor de la inulinasa y la secuencia de señal de K. marxianus mediante mutagénesis. Se logró una mayor expresión secretora de diferentes enzimas lignocelulolíticas (Zhou et al., 2018). Se utilizó un enfoque similar para secretar un anticuerpo de cadena única (scFv), mediante la construcción de cepas portadoras utilizando combinaciones de promotores (PMDH1 y PACO1) y péptidos señal de secreción (KmINUss y Sc $\alpha$ -MFss) (Nambu-Nishida et al., 2018).

Con la tecnología de CRISPRi se modularon el ciclo del ácido tricarbóxico y la cadena de transporte de electrones. La eliminación simultánea de los genes ACO2b, SDH2, RIP1 y MSS51, dio como resultado un aumento de 3,8 veces en la productividad de acetato de etilo sobre la capacidad natural (Löbs et al., 2018).

*Saccharomyces cerevisiae*, levadura de alto interés industrial, ha sido modificada genéticamente para mejorar sus características. Mediante el uso de tecnología de plásmidos (pUG6), se sobreexpresó la catalasa citosólica (CTT1) sustituyendo el promotor nativo por el fuerte promotor constitutivo TPI1. El aumento de la actividad de la catalasa se confirmó y posteriormente se correlacionó con la disminución de los niveles de especies reactivas de oxígeno (Abbott et al., 2009). Al usar PCR de fusión, el gen Haa1 fue sobreexpresado en *S. cerevisiae* con la finalidad de mejorar la tolerancia al ácido acético; los resultados demuestran una mayor capacidad para reducir la concentración intracelular del ácido (Tanaka et al., 2012). En conjunto con el plásmido AUR101 y el promotor HSP12, se introdujo el gen mutante de la xilosa isomerasa (LpXI(T63I)) en *S. cerevisiae* con la

finalidad de aumentar la producción de etanol a partir de xilosa. Los resultados muestran un consumo eficiente del azúcar para la producción de alcohol (Kobayashi et al., 2018).

Se han identificado correlaciones entre determinados microorganismos del kéfir y los niveles de diferentes compuestos volátiles, así como la presencia de genes necesarios para su producción (Walsh et al., 2016). Se sugieren investigaciones en la sobreexpresión, modificación o recombinación de estos genes para mejorar las características sensoriales de la bebida.

### **1. Kefiran: Exopolisacárido (EPS) del kéfir**

El kefiran, un polisacárido extracelular abundante en grupos hidroxilos, es obtenido a partir de *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lb. kefirgranum*, *Lb. parakefir*, *Lb. kefir*, *Lactococcus lactis*, y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Jeong et al., 2017; Micheli et al., 1999). El biopolímero es comestible, soluble en agua, con cantidades aproximadamente iguales de D-glucosa y D-galactosa en una secuencia de cadena, cuya estructura se observa en la Fig. 6. Este biopolímero ha atraído atención, debido a sus características únicas (Moradi & Kalanpour, 2019), como el comportamiento reológico, biodegradabilidad, biocompatibilidad, efecto emulsionante, efecto estabilizador, resistencia a la hidrólisis, propiedades de barrera física y mecánica, y la permeabilidad al vapor de agua (Barukčić et al., 2017; Chen et al., 2015; Fels et al., 2018; Luang-In et al., 2018; Micheli et al., 1999; Wang et al., 2008).

En busca de mejorar la producción y características del kefiran, se ha utilizado diferentes tecnologías como: ensayos a varias

temperaturas, agregados al medio y concentración de suero como sustrato. Se obtuvo el mayor aumento de la biomasa de kefirán al usar leche orgánica como medio de cultivo y los parámetros de incubación: 24 h a 25°C, con una velocidad de agitación de 125 rpm y fuentes minerales y vitaminas en el medio convencional (Pais et al., 2018; Pop et al., 2014). Con el mismo interés de elevar la producción del EPS, se probó la aplicación de estrés osmótico. Los resultados indican que al someter la producción de kefirán a un estrés de 550 mOsmol.kg-1 y 1.0 g.L-1 de Triton X-100 al tiempo 0, se obtiene un rendimiento mayor al 72.9%, con respecto a la producción normal (Dailin et al., 2020). El aumento se explica por la acumulación de solutos en el citoplasma de las células bacterianas, asegurando así una mayor presión interna de solutos y un flujo continuo de moléculas de agua hacia el interior celular (Le Marrec, 2011).

Para mejorar las características del kefirán se desarrollaron películas bio-nanocompuestas a base de EPS con diferentes cantidades de montmorillonita (MMT) y nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Los resultados mostraron un aumento de las propiedades físicas y mecánicas, proporcionando una estructura compacta al añadir MMT. Mientras que, al agregar TiO<sub>2</sub> como nanopartícula metálica, cambiaron los atributos de color y aumentó la transparencia de los nanocompuestos (Zolfi et al., 2014).

### **Empaques**

El actual problema mundial de contaminación con plásticos ha generado una demanda de empaques que lo mitiguen. El kefirán, además de poseer una excelente resistencia y unas características comparables

a las de los materiales de envasado tradicionales, tiene otras ventajas, como ser compostable, biodegradable y/o comestible (Radhouani et al., 2018). Estas propiedades lo hacen amigable con el medio ambiente y más sostenible a largo plazo.

Zolfi et al. (2014) demostraron que utilizando tecnología de nanopartículas se genera una barrera eficiente contra el oxígeno; además, gracias a la capacidad física y mecánica, se vuelve impermeable al agua. En otro estudio, se mezcló kefirán con almidón de maíz, las moléculas de ambos se interrelacionan favorablemente mediante la formación de fuertes enlaces de hidrógeno entre ellas, sirviendo de protección contra la difusión del agua (Motedayen et al., 2013), solventando el desafío de impermeabilidad de los materiales en la industria de empaques.

Otro reto al que se enfrenta el kefirán, en su prospección como empaque, es la acumulación de microorganismos; sin embargo, Rodrigues et al. (2005) demostraron su eficiencia como agente antimicrobiano. Esto pone de manifiesto el potencial del kefirán en la industria de empaques, enfocándose en beneficiar a las futuras industrias alimentarias en términos de mantenimiento de la seguridad e inocuidad de los alimentos.

### **Aplicaciones biomédicas**

Los atributos del kefirán han despertado el interés en la comunidad médica, por lo que se ha estudiado la capacidad del EPS como vehículo de probióticos. Los resultados experimentales muestran la capacidad del kefirán de preservar la viabilidad de los probióticos con una pequeña pérdida tras 35 días de almacenamiento a 20°C, reduciendo la susceptibilidad de los microorganismos probióticos libres

a las condiciones ácidas. Asimismo, el estudio sugiere el uso del kefirán como vehículo de administración de fármacos en enfermedades gastrointestinales (Piermaria et al., 2015).

En conjunto con la acción probiótica del kéfir, el kefirán puede ser utilizado para el tratamiento de heridas cutáneas. Se ha demostrado la acción de *Lactobacillus brevis* en la inflamación inducida a ratas además de acelerar el proceso de cicatrización (Nasrabadi & Ebrahimi, 2011). Se sugiere la investigación del kefirán como vendaje activo para el tratamiento de heridas en la piel.

### **Conclusión**

En este trabajo se ha recopilado investigaciones actuales sobre el kéfir y sus aplicaciones a nivel mundial. Además, se proponen investigaciones para incrementar los beneficios del kéfir. El potencial total del consorcio microbiano todavía está por descubrirse. Aunque la fortaleza de la bebida son los beneficios en la salud, tiene aplicaciones que aún están por ser investigadas. Se propone la modificación genética de los microorganismos para mejorar las características sensoriales de la bebida e impulsar los beneficios en la salud del consumidor, industria y medio ambiente.

### **Agradecimientos**

Las figuras utilizadas en el artículo fueron realizadas con BioRender.com

### **Referencias bibliográficas**

Abbott, D. A., Suir, E., Duong, G. H., De Hulster, E., Pronk, J. T., & Van Maris, A. J. A. (2009). Catalase overexpression reduces lactic acid-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2320–2325. <https://doi.org/10.1128/AEM.00009-09>

Aboubakr, H. A., El-Banna, A. A., Youssef, M. M., Al-Sohaimy, S. A. A., & Goyal, S. M. (2014). Antiviral Effects of *Lactococcus lactis* on Feline Calicivirus, A Human Norovirus Surrogate. *Food and Environmental Virology*, 6(4), 282–289. <https://doi.org/10.1007/s12560-014-9164-2>

Açik, M., Çakiroğlu, F. P., Altan, M., & Baybo, T. (2020). Alternative source of probiotics for lactose intolerance and vegan individuals: sugary kefir. *Food Science and Technology, AHEAD*. <https://doi.org/10.1590/fst.27919>

Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., & Afreen, A. (2013). Kefir and Health: A Contemporary Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 422–434. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.540360>

Aiello, F., Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Carullo, G., Leporini, M., & Loizzo, M. R. (2020). Improving kefir bioactive properties by functional enrichment with plant and agro-food waste extracts. *Fermentation*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6030083>

Alihosseini, N., Moahboob, S. A., Farrin, N., Mobasser, M., Taghizadeh, A., & Ostadrahimi, A. R. (2017). Effect of probiotic fermented milk (KEFIR) on serum level of insulin and homocysteine in type 2 diabetes patients. *Acta Endocrinologica*, 13(4), 431–436. <https://doi.org/10.4183/aeb.2017.431>

Alsayadi, M., Al jawfi, Y., Belarbi, M., & Sabri, F. (2013). ANTIOXIDANT POTENCY OF WATER KEFIR. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(2), 2444–2447.

Amorim, F. G., Coitinho, L. B., Dias, A. T., Friques, A. G. F., Monteiro, B. L., Rezende, L. C. D. de, Pereira, T. de M. C., Campagnaro, B. P., De Pauw, E., Vasquez, E. C., & Quinton, L. (2019). Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food Chemistry*, 282, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.010>

- Apar, D. K., Demirhan, E., Özel, B., & Özbek, B. (2017). Kefir Grain Biomass Production: Influence of Different Culturing Conditions and Examination of Growth Kinetic Models. *Journal of Food Process Engineering*, 40(1), e12332. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12332>
- Arévalo, F. H., & Quispe, A. (2008). Control y regulación del pH en una fermentación láctica utilizando carbonato de calcio como regulador y microbiota de granos de Kefir como agente biológico. *Ciencia y Desarrollo*, 9, 5. <https://doi.org/10.21503/cyd.v9i0.1175>
- Aryana, K. J., & Olson, D. W. (2017). A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987–10013. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981>
- Atanassova, M., Dousset, X., Montcheva, P., Ivanova, I., & Haertle, T. (1999). Microbiological study of kefir grains. Isolation and identification of high activity bacteriocin producing strains. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 13(1), 55–60. <https://doi.org/10.1080/13102818.1999.10819019>
- Azhar, M. A., & Munaim, M. S. A. (2019). Isolation and Molecular Identification of Potential Probiotic Yeast Strains Found in Malaysian Kefir Drinks Samples. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 8(4), 128–131. <https://doi.org/10.18178/ijpmbs.8.4.128-131>
- Azi, F., Tu, C., Meng, L., Zhiyu, L., Cherinet, M. T., Ahmadullah, Z., & Dong, M. (2020). Metabolite dynamics and phytochemistry of a soy whey-based beverage bio-transformed by water kefir consortium. *Food Chemistry*, 342, 128225. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128225>
- Badr El-Din, N. K., Shabana, S. M., Abdulmajeed, B. A., & Ghoneum, M. (2020). A novel kefir product (Pft) inhibits ehrlich ascites carcinoma in mice via induction of apoptosis and immunomodulation. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02901-y>
- Barão, C. E., Klososki, S. J., Pinheiro, K. H., Marcolino, V. A., Junior, O. V., da Cruz, A. G., da Silva, T. T., & Pimentel, T. C. (2019). Growth kinetics of kefir biomass: Influence of the incubation temperature in milk. *Chemical Engineering Transactions*, 75, 499–504. <https://doi.org/10.3303/CET1975084>
- Barukčić, I., Gracin, L., Jambrak, A. R., & Božanić, R. (2017). Comparison of chemical, rheological and sensory properties of kefir produced by kefir grains and commercial kefir starter. *Mljekarstvo*, 67(3), 169–176. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2017.0301>
- Burcu, U. nsal U. N., & Alper, A. (2013). Phylogenetic identification of bacteria within kefir by both culture-dependent and culture-independent methods. *African Journal of Microbiology Research*, 7(36), 4533–4538. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6064>
- Caiza, L. (2019). Elaboración de una Bebida Fermentada a partir de Lactosuero y Leche de Chocho (lupinus mutabilis sweet) utilizando al Kéfir de Agua como Fermento. Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC).
- Can, G., Topuz, E., Derin, D., Durna, Z., & Aydiner, A. (2009). Effect of kefir on the quality of life of patients being treated for colorectal cancer. In *Oncology Nursing Forum* (Vol. 36, Issue 6, p. 643). *Oncol Nurs Forum*. <https://doi.org/10.1188/09.ONF.E335-E342>
- Cavicchioli, V. Q., Carvalho, O. V. de, Paiva, J. C. de, Todorov, S. D., Silva Júnior, A., & Nero, L. A. (2018). Inhibition of herpes simplex virus 1 (HSV-1) and poliovirus (PV-1) by bacteriocins from lactococcus lactis subsp. lactis and enterococcus durans strains isolated from goat milk. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(1), 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.020>
- Cevikbas, A., Yemni, E., Ezzedenn, F. W., Yardimici, T., Cevikbas, U., & Stohs, S. J. (1994). Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytotherapy Research*, 8(2), 78–82. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650080205>

- Chen, H. C., Wang, S. Y., & Chen, M. J. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 25(3), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.01.003>
- Chen, H. L., Tsai, T. C., Tsai, Y. C., Liao, J. W., Yen, C. C., & Chen, C. M. (2016). Kefir peptides prevent high-fructose corn syrup-induced non-alcoholic fatty liver disease in a murine model by modulation of inflammation and the JAK2 signaling pathway. *Nutrition and Diabetes*, 6(12), 237. <https://doi.org/10.1038/nutd.2016.49>
- Chen, H. L., Tung, Y. T., Chuang, C. H., Tu, M. Y., Tsai, T. C., Chang, S. Y., & Chen, C. M. (2014). Kefir improves bone mass and microarchitecture in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis International*, 26(2), 589–599. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2908-x>
- Chen, H. L., Tung, Y. T., Tsai, C. L., Lai, C. W., Lai, Z. L., Tsai, H. C., Lin, Y. L., Wang, C. H., & Chen, C. M. (2014). Kefir improves fatty liver syndrome by inhibiting the lipogenesis pathway in leptin-deficient ob/ob knockout mice. *International Journal of Obesity*, 38(9), 1172–1179. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.236>
- Chen, W., Chen, R., Chen, W., Chen, H., & Zhang, G. (2018). Comparative Evaluation of the Antioxidant Capacities, Organic Acids, and Volatiles of Papaya Juices Fermented by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Quality*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9490435>
- Chen, Y. T., Yang, N. S., Lin, Y. C., Ho, S. T., Li, K. Y., Lin, J. S., Liu, J. R., & Chen, M. J. (2018). A combination of *Lactobacillus Mali* APS1 and dieting improved the efficacy of obesity treatment via manipulating gut microbiome in mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23844-y>
- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y., & Wang, Z. (2015). Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 43, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.004>
- Choi, J. W., Kang, H. W., Lim, W. C., Kim, M. K., Lee, I. Y., & Cho, H. Y. (2017). Kefir prevented excess fat accumulation in diet-induced obese mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 81(5), 958–965. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1258984>
- Corona, O., Randazzo, W., Miceli, A., Guarcello, R., Francesca, N., Erten, H., Moschetti, G., & Settanni, L. (2016). Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.014>
- Costa, N. E., Hannon, J. A., Guinee, T. P., Auty, M. A. E., McSweeney, P. L. H., & Beresford, T. P. (2010). Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3469–3486. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-3008>
- Dailin, D. J., Elsayed, E. A., Malek, R. A., Hanapi, S. Z., Selvamani, S., Ramli, S., Sukmawati, D., Sayyed, R. Z., & El Enshasy, H. A. (2020). Efficient kefir production by *Lactobacillus kefirifaciens* ATCC 43761 in submerged cultivation: Influence of osmotic stress and nonionic surfactants, and potential bioactivities. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12), 8513–8523. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.09.030>
- Davras, F., Zeynep, B. G.-S., & Tas, T. K. (2018). Immunological effects of Kefir produced from Kefir grains versus starter cultures when fed to mice. *Functional Foods in Health and Disease*, 8(8), 412–423. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v8i8.533>

- de Souza, B. L., Magalhães-Guedes, K. T., Lemos, P. V. F., Maciel, L. F., Dias, D. R., Druzian, J. I., & Schwan, R. F. (2020). Development of arrowroot flour fermented by kefir grains. *Journal of Food Science*, 85(11), 3722–3730. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15472>
- Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., & Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 43–53. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>
- Dobson, A., O’Sullivan, O., Cotter, P. D., Ross, P., & Hill, C. (2011). High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microbiology Letters*, 320(1), 56–62. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02290.x>
- Dume, S., & Sánchez, E. (2019). Evaluación de la capacidad antioxidante de kéfir con leche UHT descremada a diferentes tiempos de fermentación [Universidad de Guayaquil]. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2004.3.66178>
- El Golli-Bennour, E., Timoumi, R., Annaibi, E., Mokni, M., Omezzine, A., Bacha, H., & Abid-Essefi, S. (2019). Protective effects of kefir against deltamethrin-induced hepatotoxicity in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(18), 18856–18865. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05253-4>
- Farnworth, E. R. (2005). Kefir - a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1), 1–17. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.13938>
- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers*, 189, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>
- Fujiwara, D., Inoue, S., Wakabayashi, H., & Fujii, T. (2004). The Anti-Allergic Effects of Lactic Acid Bacteria Are Strain Dependent and Mediated by Effects on both Th1/Th2 Cytokine Expression and Balance. *International Archives of Allergy and Immunology*, 135(3), 205–215. <https://doi.org/10.1159/000081305>
- Gamba, R. R., Caro, C. A., Martínez, O. L., Moretti, A. F., Giannuzzi, L., De Antoni, G. L., & León Peláez, A. (2016). Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. *International Journal of Food Microbiology*, 235, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.038>
- Gao, J., Gu, F., Abdella, N. H., Ruan, H., & He, G. (2012). Investigation on Culturable Microflora in Tibetan Kefir Grains from Different Areas of China. *Journal of Food Science*, 77(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02805.x>
- Gao, J., Gu, F., Ruan, H., Chen, Q., He, J., & He, G. (2013). Induction of apoptosis of gastric cancer cells SGC7901 in vitro by a cell-free fraction of Tibetan kefir. *International Dairy Journal*, 30(1), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.11.011>
- Gao, W., & Zhang, L. (2018). Genotypic diversity of bacteria and yeasts isolated from Tibetan kefir. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 1535–1540. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13735>
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., Di Mauro, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D., & Clementi, F. (2015). Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology*, 49(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.017>
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 639–652. <https://doi.org/10.1017/S0022029901005210>
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2010). Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 1980, 327–340.



- <https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch18>
- Gaware, V., Kotade, K., Dolas, R., Dhamak, K., Somwanshi, S., Nikam, V., Khadse, A., Kashid, V., & Gaware, V. M. (2011). The magic of kefir: a review. *Pharmacologyonline*, 1, 376–386.
- Ghazi Mahdi AL-Shemmari, I., Abdel mahdi Kassim Altaee, R., & Hameed Hassan, A. (2018). Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidimic activity of Kefir in alloxan induced diabetes mellitus rat (Vol. 2). <http://www.sjomr.org>
- Golowcycz, M. A., Gugliada, M. J., Hollmann, A., Delfederico, L., Garrote, G. L., Abraham, A. G., Semorile, L., & De Antoni, G. (2008). Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: Potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research*, 75(2), 211–217. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003117>
- Gondaliya, S. M., Professor, A., & Ramani, V. M. (2021). Determination of Probiotic Properties of *L. fermentum* MT308789 and *L.oris* MT308790 Isolated from Mother Breast Milk. *Int. J. Life Sci. Pharma Res*, 11(1), 63–72. <https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2021.11.1.L63-72>
- Goršek, A., & Tramšek, M. (2008). Kefir grains production-An approach for volume optimization of two-stage bioreactor system. *Biochemical Engineering Journal*, 42(2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.009>
- Guerra, M. J., & Mujica, M. V. (2010). Physical and chemical properties of granulated cane sugar “panelas.” *Food Science and Technology*, 30(1), 250–257. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612010005000012>
- Gunenc, A., Yeung, M. H., Lavergne, C., Bertinato, J., & Hosseinian, F. (2017). Enhancements of antioxidant activity and mineral solubility of germinated wrinkled lentils during fermentation in kefir. *Journal of Functional Foods*, 32, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.016>
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.046>
- Hamida, R. S., Shami, A., Ali, M. A., Almo-hawes, Z. N., Mohammed, A. E., & Bin-Meferij, M. M. (2021). Kefir: A protective dietary supplementation against viral infection. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 133). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110974>
- Hardy, G. (2000). Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition*, 16(7–8), 688–689. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00332-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00332-4)
- Harta, O., Iconomopoulou, M., Bekatorou, A., Nigam, P., Kontominas, M., & Koutinas, A. A. (2004). Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter. *Food Chemistry*, 88(2), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.043>
- Hatmal, M. M., Nuirat, A., Zihlif, M. A., & Taha, M. O. (2018). Exploring the influence of culture conditions on kefir’s anticancer properties. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3771–3777. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13539>
- Ho, J. N., Choi, J. W., Lim, W. C., Kim, M. K., Lee, I. Y., & Cho, H. Y. (2013). Kefir inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of adipogenic transcription factor expression. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(3), 485–490. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5792>
- Honda, K., Moto, M., Uchida, N., He, F., & Hashizume, N. (2012). Anti-diabetic effects of lactic acid bacteria in normal and type 2 diabetic mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 51(2), 96–101. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.11-07>
- Hong, W, Chen, Y., & Chen, M. (2010). The Antiallergic Effect of Kefir Lactobacilli. *Journal of Food Science*, 75(8), H244–H253. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01787.x>
- Hong, Wei-sheng, Chen, H., Chen, Y., & Chen, M. (2009). Effects of kefir supernatant

- and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophage. *International Dairy Journal*, 19(4), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.010>
- Hsieh, H. H., Wang, S. Y., Chen, T. L., Huang, Y. L., & Chen, M. J. (2012). Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.014>
- Huang, Y., Wu, F., Wang, X., Sui, Y., Yang, L., & Wang, J. (2013). Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2816–2825. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6371>
- Jeong, D., Kim, D. H., Kang, I. B., Kim, H., Song, K. Y., Kim, H. S., & Seo, K. H. (2017). Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*, 78, 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.033>
- Kabak, B., & Dobson, A. D. W. (2011). An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 248–260. <https://doi.org/10.1080/10408390903569640>
- Kabakcı, S., Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2020). Changes in the quality of kefir fortified with anthocyanin-rich juices during storage. *Food Chemistry*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126977>
- Kanbak, G., Uzuner, K., Kuşat Ol, K., Oğlakçı, A., Kartkaya, K., & Şentürk, H. (2014). Effect of kefir and low-dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unihypertensive rats with 4 weeks salt diet. *Clinical and Experimental Hypertension*, 36(1), 1–8. <https://doi.org/10.3109/10641963.2013.783046>
- Kabak, B., & Dobson, A. D. W. (2011). An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 248–260. <https://doi.org/10.1080/10408390903569640>
- Kabakcı, S., Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2020). Changes in the quality of kefir fortified with anthocyanin-rich juices during storage. *Food Chemistry*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126977>
- Kabakcı, S., Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2020). Changes in the quality of kefir fortified with anthocyanin-rich juices during storage. *Food Chemistry*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126977>
- Katechaki, E., Panas, P., Rapti, K., Kandilogiannakis, L., & Koutinas, A. A. (2008). Production of hard-type cheese using free or immobilized freeze-dried kefir cells as a starter culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 5316–5323. <https://doi.org/10.1021/jf703585y>
- Kesenkaş, H., Dinkçi, N., Seçkin, K., Kinik, Ö., Gönc, S., İnek, F., Soya, V., Karışimlarından, S., Kefirlerin, Ü., Özellikleri, A., Bilgisi, E., Makalesi, A., Gıda, T., & Yazar, S. (2011). Antioxidant Properties of Kefir Produced from Different Cow and Soy Milk Mixtures. *JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES*, 17(3), 253–259. [www.agri.ankara.edu.tr/dergi](http://www.agri.ankara.edu.tr/dergi)
- Kesmen, Z., & Kacmaz, N. (2011). Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *Journal of Food Science*, 76(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02191.x>
- Khoury, N., El-Hayek, S., Tarras, O., El-Sabban, M., El-Sibai, M., & Rizk, S. (2014). Kefir exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion. *International Journal of Oncology*, 45(5), 2117–2127. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2635>

- Kim, D. H., Chon, J. W., Kim, H., & Seo, K. H. (2015). Modulation of intestinal microbiota in mice by kefir administration. *Food Science and Biotechnology*, 24(4), 1397–1403. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0179-8>
- Kim, D. H., Jeong, D., Kim, H., Kang, I. B., Chon, J. W., Song, K. Y., & Seo, K. H. (2016). Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(6), 787–790. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.6.787>
- Kim, D. H., Jeong, D., Kim, H., & Seo, K. H. (2019). Modern perspectives on the health benefits of kefir in next generation sequencing era: Improvement of the host gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(11), 1782–1793. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1428168>
- Kim, D. H., Kim, H., Jeong, D., Kang, I. B., Chon, J. W., Kim, H. S., Song, K. Y., & Seo, K. H. (2017). Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobacteria: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 44, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.02.014>
- Kobayashi, Y., Sahara, T., Ohgiya, S., Kamagata, Y., & Fujimori, K. E. (2018). Systematic optimization of gene expression of pentose phosphate pathway enhances ethanol production from a glucose/xylose mixed medium in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0670-8>
- Koh, W. Y., Utra, U., Rosma, A., Effarizah, M. E., Rosli, W. I. W., & Park, Y. H. (2018). Development of a novel fermented pumpkin-based beverage inoculated with water kefir grains: a response surface methodology approach. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 525–535. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0245-5>
- Kök-Taş, T., Seydim, A. C., Özer, B., & Guzel-Seydim, Z. B. (2013). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 780–789. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5753>
- Kolakowski, P., & Ozimkiewicz, M. (2012). Restoration of kefir grains subjected to different treatments. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 140–145. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00746.x>
- Korsak, N., Taminiau, B., Leclercq, M., Nezer, C., Crevecoeur, S., Ferauche, C., Detry, E., Delcenserie, V., & Daube, G. (2015). Short communication: Evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3684–3689. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9065>
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., & Pehu, E. (2006). Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. *Agriculture and Rural Development*, 1–95. <http://www.worldbank.org/rural>
- Kotova, I. B., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2016). Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 932, pp. 93–121). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2016\\_2](https://doi.org/10.1007/5584_2016_2)
- Kwak, N. S., & Jukes, D. J. (2001). Functional foods. Part 1: The development of a regulatory concept. *Food Control*, 12(2), 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00028-1)
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2019). The Buffer Capacity and Calcium Concentration of Water Influence the Microbial Species Diversity, Grain Growth, and Metabolite Production During Water Kefir Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2876. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02876>
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water Kefir fermentation.

- Applied and Environmental Microbiology, 80(8), 2564–2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>
- Le Marrec, C. (2011). Responses of Lactic Acid Bacteria to Osmotic Stress. In *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria* (pp. 67–90). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8_4)
- Leite, A. M. de O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 44, Issue 2, pp. 341–349). Sociedade Brasileira de Microbiologia. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200001>
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Lim, J., Kale, M., Kim, D. H., Kim, H. S., Chon, J. W., Seo, K. H., Lee, H. G., Yokoyama, W., & Kim, H. (2017). Antiobesity Effect of Exopolysaccharides Isolated from Kefir Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(46), 10011–10019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03764>
- Limbad, M., Gutierrez Maddox, N., Hamid, N., & Kantono, K. (2020). Sensory and Physicochemical Characterization of Sourdough Bread Prepared with a Coconut Water Kefir Starter. *Foods*, 9(9), 1165. <https://doi.org/10.3390/foods9091165>
- Lin, M. Y., & Yen, C. L. (1999). Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1460–1466. <https://doi.org/10.1021/jf9811491>
- Liu, J. R., Lin, Y. Y., Chen, M. J., Chen, L. J., & Lin, C. W. (2005). Antioxidative activities of kefir. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(4), 567–573. <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.567>
- Liu, J., Wang, S., Lin, Y., & Lin, C. (2002). Antitumor Activity of Milk Kefir and Soy Milk Kefir in Tumor-Bearing Mice. *Nutrition and Cancer*, 44(2), 182–187. <https://doi.org/10.1207/S15327914NC4402>
- Löbs, A. K., Schwartz, C., Thorwall, S., & Wheeldon, I. (2018). Highly Multiplexed CRISPRi Repression of Respiratory Functions Enhances Mitochondrial Localized Ethyl Acetate Biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*. *ACS Synthetic Biology*, 7(11), 2647–2655. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00331>
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezal, N., & Garaizar, J. (2006). Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. In *Revista Iberoamericana de Micología* (Vol. 23, Issue 2, pp. 67–74). Asociacion Espanola de Micologia. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(06\)70016-x](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(06)70016-x)
- Luang-In, V., Saengha, W., Yotchaisarn, M., & Udomwong, P. (2018). Microbial Strains and Bioactive Exopolysaccharide Producers from Thai Water Kefir. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.4014/mb1.1804.04019>
- Ma, Y., Liu, J., Hou, J., Dong, Y., Lu, Y., Jin, L., Cao, R., Li, T., & Wu, J. (2014). Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing HSP65 and tandemly repeated P277 reduces the incidence of type I diabetes in non-obese diabetic mice. *PLoS ONE*, 9(8), e105701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105701>
- Magalhães, K. T., de Melo Pereira, G. V., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2011). Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 693–702. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200034>
- Magalhães, K. T., de Pereira, G. V. M., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2010). Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1241–1250. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0294-x>

- Mainville, I., Robert, N., Lee, B., & Farnworth, E. R. (2006). Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.001>
- Margulis, L., Sagan, D., & Margulis, L. (1997). From Kefir to Death. In *Slanted Truths* (pp. 83–90). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2284-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2284-2_7)
- Marques, V. D., Franzolin, M. R., Sanabani, S. S., Vigerelli, H., Piazza, R. M. F., Pimenta, D. C., Venâncio, T., Neves, I. V., de Sousa Silva, H. G., dos Santos Courrol, D., Mendonça-Previato, L., Previato, J. O., Jorge, S. A. C., & de Oliveira Domingos, M. (2020). A new class of antimicrobial molecules derived from kefir, effective against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73651-7>
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2013). Sequencing-Based Analysis of the Bacterial and Fungal Composition of Kefir Grains and Milks from Multiple Sources. *PLoS ONE*, 8(7), e69371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069371>
- Marshall, V. M., & Cole, W. M. (1985). Methods for Making Kefir and Fermented Milks Based on Kefir. *Journal of Dairy Research*, 52(3), 451–456. <https://doi.org/10.1017/S0022029900024353>
- Matos, R. S., Ramos, G. Q., da Fonseca Filho, H. D., & Tãlu, Ş. (2020). Advanced micromorphology study of microbial films grown on Kefir loaded with Açai extract. *Micron*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2020.102912>
- Mei, J., Guo, Q., Wu, Y., & Li, Y. (2014). Microbial Diversity of a Camembert-Type Cheese Using Freeze-Dried Tibetan Kefir Coculture as Starter Culture by Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *PLoS ONE*, 9(10), e111648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111648>
- Menrad, K., K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56(Nr.2-3), 181–188.
- Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., & Crescenzi, V. (1999). Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(1), 69–74. <https://doi.org/10.1007/s002530051616>
- Mogheth, S. A. El, & El Gendy, A. O. (2017). Exploring the Antimicrobial and Hepatoprotective Effects of Kefir; A Probiotic Fermented Milk. *Journal of Probiotics & Health*, 05(02). <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000173>
- Mollet, B., & Rowland, I. (2002). Functional foods: At the frontier between food and pharma. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(5), 483–485. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00375-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00375-0)
- Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., & Ramírez-Cárdenas, L. (2014). Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. *ACI Avances En Ciencias e Ingenierías*, 6(1). <https://doi.org/10.18272/aci.v6i1.160>
- Moradi, Z., & Kalanpour, N. (2019). Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: A review. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 223). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115100>
- Moreira, M. E. C., Santos, M. H. D., Zolini, G. P. P., Wouters, A. T. B., Carvalho, J. C. T., & Schneedorf, J. M. (2008). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of a carbohydrate fraction isolated from sugary kefir. *Journal of Medicinal Food*, 11(2), 356–361. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.329>
- Motedayen, A. A., Khodaiyan, F., & Salehi, E. A. (2013). Development and characterisation of composite films made of kefir and starch. *Food Chemistry*, 136(3–4), 1231–1238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.073>

- Nagira, T., Narisawa, J., Kusumoto, K., Teruya, K., Katakura, Y., Barnes, D., Tokumaru, S., & Shirahata, S. (1999). Protection of Human Melanoma Cells from UV Damage by a Fermented Milk, Kefir. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 10, 369–373. [https://doi.org/10.1007/0-306-46865-4\\_64](https://doi.org/10.1007/0-306-46865-4_64)
- Nalbantoglu, U., Cakar, A., Dogan, H., Abaci, N., Ustek, D., Sayood, K., & Can, H. (2014). Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food Microbiology*, 41, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.014>
- Nambu-Nishida, Y., Nishida, K., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2018). Genetic and physiological basis for antibody production by *Kluyveromyces marxianus*. *AMB Express*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0588-1>
- Nasrabadi, H., & Ebrahimi, T. (2011). Comparison of the effects of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum* on cutaneous wound healing in rats. *African Journal of Microbiology Research*, 5(24), 4226–4233. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.956>
- Nikolaou, A., Galanis, A., Kanellaki, M., Tassou, C., Akrida-Demertzi, K., & Kourkoutas, Y. (2017). Assessment of free and immobilized kefir culture in simultaneous alcoholic and malolactic cider fermentations. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.034>
- Nikolaou, A., Kandylis, P., Kanellaki, M., & Kourkoutas, Y. (2020). Winemaking using immobilized kefir cells on natural zeolites. *LWT*, 133, 110043. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110043>
- Nikolaou, A., Nelios, G., Kanellaki, M., & Kourkoutas, Y. (2020). Freeze-dried immobilized kefir culture in cider-making. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(8), 3319–3327. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10363>
- Nikolaou, A., Sgouros, G., Mitropoulou, G., Santarmaki, V., & Kourkoutas, Y. (2020). Freeze-Dried Immobilized Kefir Culture in Low Alcohol Winemaking. *Foods*, 9(2), 115. <https://doi.org/10.3390/foods9020115>
- Nikolaou, A., Tsakiris, A., Kanellaki, M., Bezirtzoglou, E., Akrida-Demertzi, K., & Kourkoutas, Y. (2019). Wine production using free and immobilized kefir culture on natural supports. *Food Chemistry*, 272, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.015>
- Nogueira, L. K., Aguiar-Oliveira, E., Kamimura, E. S., & Maldonado, R. R. (2016). Milk and açai berry pulp improve sensorial acceptability of kefir-fermented milk beverage. *Acta Amazonica*, 46(4), 417–424. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201600173>
- O'Brien, K. V., Aryana, K. J., Prinyawiwatkul, W., Ordonez, K. M. C., & Boenke, C. A. (2016). Short communication: The effects of frozen storage on the survival of probiotic microorganisms found in traditionally and commercially manufactured kefir. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 7043–7048. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10284>
- Olaya, N. N., Ulloa, J. C., Velez, F. A., Fernandez, K. P., Salas, S. P., & Gutierrez, M. F. (2016). In vitro antiviral activity of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* against rotavirus infection monitored by NSP4 protein production. *Journal of Applied Microbiology*, 120(4), 1041–1051. <https://doi.org/10.1111/jam.13069>
- Oliveira, A. P. de, Santos, G. A. dos, Nomura, C. S., & Naozuka, J. (2019). Elemental chemical composition of products derived from kefir fermented milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 78, 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.02.005>
- Ostadrhimi, A., Taghizadeh, A., Mobasseri, M., Farrin, N., Payahoo, L., Beyramalipoor Gheshlaghi, Z., & Vahedjabbari, M. (2015). Effect of probiotic fermented milk (Kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Iranian Journal of Public Health*, 44(2), 228–237. <http://ijph.tums.ac.ir>

- Otles, S., & Cagindi, O. (2003). Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), 54–59. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.54.59>
- Pais, J., Nuñez, J., Rivera-Intriago, L., Trujillo, L., Alvarado, P., & Cuaran, M. (2018). Response Surface Methodology to Optimize a Bioprocess for Kefiran Production. *Prensa Med Argent*, 104(2), 5–21. <https://doi.org/10.4172/0032-745X.1000285>
- Perna, A., Simonetti, A., & Gambacorta, E. (2019). Phenolic content and antioxidant activity of donkey milk kefir fortified with sulla honey and rosemary essential oil during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 74–81. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12561>
- Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrrote, G., & Abraham, A. (2015). Edible kefir films as vehicle for probiotic microorganisms. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.009>
- Plessas, S., Pherson, L., Bekatorou, A., Nigam, P., & Koutinas, A. A. (2005). Bread making using kefir grains as baker's yeast. *Food Chemistry*, 93(4), 585–589. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.034>
- Plessas, Stavros, Trantallidi, M., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Nigam, P., & Koutinas, A. A. (2007). Immobilization of kefir and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making. *Food Chemistry*, 105(1), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.065>
- Pop, C., Apostu, S., Salanță, L., Rotar, A. M., Sindic, M., Mabon, N., & Socaciu, C. (2014). Influence of Different Growth Conditions on the Kefir Grains Production, used in the Kefiran Synthesis. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 71(2). <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:10802>
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue OCT, p. 1177). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>
- Putri, Y. D., Setiani, N. A., & Warya, S. (2020). The Effect of Temperature, Incubation and Storage Time on Lactic Acid Content, pH, and Viscosity of Goat Milk Kefir. *Current Research on Biosciences and Biotechnology*, 2(1), 101–104. <https://doi.org/10.5614/crbb.2020.2.1/hpmq5042>
- Radhouani, H., Gonçalves, C., Maia, F. R., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2018). Kefiran biopolymer: Evaluation of its physicochemical and biological properties. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 33(5), 461–478. <https://doi.org/10.1177/0883911518793914>
- Rafie, N., Hamedani, S. G., Ghiasv, R., & Miraghajani, M. (2015). Kefir and cancer: A systematic review of literatures. In *Archives of Iranian Medicine* (Vol. 18, Issue 12, pp. 852–857). Academy of Medical Sciences of I.R. Iran. <https://doi.org/0151812/AIM.0011>
- Ratray, F. P., & O'Connell, M. J. (2011). Fermented Milks: Kefir. In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition* (pp. 518–524). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00188-6>
- Rehman, R. U., Wang, Y., Wang, J., & Geng, W. (2018). Physicochemical analysis of Mozzarella cheese produced and developed by the novel EPS-producing strain *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 90–98. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12445>
- Ribeiro, A. C., Lemos, Á. T., Lopes, R. P., Mota, M. J., Inácio, R. S., Gomes, A. M. P., Sousa, S., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2020). The combined effect of pressure and temperature on kefir production—A case study of food fermentation in unconventional conditions. *Foods*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/foods9081133>

- Roberfroid, M. B. (2000a). A European consensus of scientific concepts of functional foods. *Nutrition*, 16(7–8), 689–691. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00329-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00329-4)
- Roberfroid, M. B. (2000b). Concepts and strategy of functional food science: The European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6 SUPPL.), 1660S-1664S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1660s>
- Rocha-Gomes, A., Escobar, A., Soares, J. S., da Silva, A. A., Dessimoni-Pinto, N. A. V., & Riul, T. R. (2018). Chemical composition and hypocholesterolemic effect of milk kefir and water kefir in Wistar rats. *Revista de Nutricao*, 31(2), 137–145. <https://doi.org/10.1590/1678-986520018000200001>
- Rodrigues, K. L., Gaudino Caputo, L. R., Tavares Carvalho, J. C., Evangelista, J., & Schneedorf, J. M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), 404–408. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020>
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J. M., & Marquina, D. (2003). The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 434–437. <https://doi.org/10.1078/072320203322497464>
- Sarkar, S. (2008). Biotechnological innovations in kefir production: A review. *British Food Journal*, 110(3), 283–295. <https://doi.org/10.1108/00070700810858691>
- Satir, G., & Guzel-Seydim, Z. B. (2016). How kefir fermentation can affect product composition? *Small Ruminant Research*, 134, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.10.022>
- Setiyoningrum, F., Priadi, G., & Afati, F. (2019). Supplementation of ginger and cinnamon extract into goat milk kefir. *AIP Conference Proceedings*, 2175. <https://doi.org/10.1063/1.5134633>
- Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., & Kaminogawa, S. (1998). *Lactobacillus casei* Inhibits Antigen-Induced IgE Secretion through Regulation of Cytokine Production in Murine Splenocyte Cultures. *International Archives of Allergy and Immunology*, 115(4), 278–287. <https://doi.org/10.1159/000069458>
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., & Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000186>
- Sirirat, D., & Jelena, P. (2010). Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced from Thai jasmine rice milk. *Biotechnology*, 9(3), 332–337. <https://doi.org/10.3923/biotech.2010.332.337>
- Smet, K., Raes, K., De Block, J., Herman, L., Dewettinck, K., & Coudijzer, K. (2008). A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 18(5), 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.012>
- Smith, I. M., Christensen, J. E., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2014). Yeast Modulation of Human Dendritic Cell Cytokine Secretion: An In Vitro Study. *PLoS ONE*, 9(5), e96595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096595>
- St-Onge, M. P., Farnworth, E. R., & Jones, P. J. H. (2000). Consumption of fermented and nonfermented dairy products: Effects on cholesterol concentrations and metabolism. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 71, Issue 3, pp. 674–681). American Society for Nutrition. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.3.674>
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.008>
- Sulistyaningtyas, A. R., Lunggani, A. T., & Kusdiyantini, E. (2019). Kefir produced from red rice milk by *Lactobacillus bulgaricus* and can-



- didida kefir starter. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 292(1), 012038. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/292/1/012038>
- Sulmiyati, Said, N., Fahrodi, D. U., Malaka, R., & Maruddin, F. (2019). Assessment of the antibacterial activity of goat milk kefir on *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium ATCC 14028 using a well diffusion method. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 247(1), 012051. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/247/1/012051>
- Sunmola, A. A., Ogbole, O. O., Faleye, T. O. C., Adetoye, A., Adeniji, J. A., & Aye-ni, F. A. (2019). Antiviral potentials of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus amylovorus*, and *Enterococcus hirae* against selected Enterovirus. *Folia Microbiologica*, 64(2), 257–264. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0648-6>
- Tan, K. X., Chamundeswari, V. N., & Loo, S. C. J. (2020). Prospects of kefir as a food-derived biopolymer for agri-food and biomedical applications. In *RSC Advances* (Vol. 10, Issue 42, pp. 25339–25351). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0ra02810j>
- Tanaka, K., Ishii, Y., Ogawa, J., & Shima, J. (2012). Enhancement of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the Haa1 gene, encoding a transcriptional activator. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 8161–8163. <https://doi.org/10.1128/AEM.02356-12>
- Tang, W., Li, C., He, Z., Pan, F., Pan, S., & Wang, Y. (2018). Probiotic Properties and Cellular Antioxidant Activity of *Lactobacillus plantarum* MA2 Isolated from Tibetan Kefir Grains. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(3), 523–533. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9349-8>
- Tellez, A., Corredig, M., Brovko, L. Y., & Griffiths, M. W. (2010). Characterization of immune-active peptides obtained from milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Research*, 77(2), 129–136. <https://doi.org/10.1017/S002202990999046X>
- Tiss, M., Souiy, Z., Abdeljelil, N. ben, Njima, M., Achour, L., & Hamden, K. (2020). Fermented soy milk prepared using kefir grains prevents and ameliorates obesity, type 2 diabetes, hyperlipidemia and Liver-Kidney toxicities in HFFD-rats. *Journal of Functional Foods*, 67, 103869. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103869>
- Topuz, E., Derin, D., Can, G., Kürklü, E., Çınar, S., Aykan, F., Çevikbaş, A., Dişçi, R., Durna, Z., Şakar, B., Sağlam, S., Tanyeri, H., Deniz, G., Güner, Ü., Taş, F., Guney, N., & Aydiner, A. (2008). Effect of oral administration of kefir on serum proinflammatory cytokines on 5-FU induced oral mucositis in patients with colorectal cancer. *Investigational New Drugs*, 26(6), 567–572. <https://doi.org/10.1007/s10637-008-9171-y>
- Tu, M.-Y., Chen, H.-L., Tung, Y.-T., Kao, C.-C., Hu, F.-C., & Chen, C.-M. (2015). Short-Term Effects of Kefir-Fermented Milk Consumption on Bone Mineral Density and Bone Metabolism in a Randomized Clinical Trial of Osteoporotic Patients. *PLOS ONE*, 10(12), e0144231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144231>
- Tu, M.-Y., Han, K.-Y., Chang, G. R.-L., Lai, G.-D., Chang, K.-Y., Chen, C.-F., Lai, J.-C., Lai, C.-Y., Chen, H.-L., & Chen, C.-M. (2020). Kefir Peptides Prevent Estrogen Deficiency-Induced Bone Loss and Modulate the Structure of the Gut Microbiota in Ovariectomized Mice. *Nutrients*, 12(11), 3432. <https://doi.org/10.3390/nu12113432>
- Tung, M. C., Lan, Y. W., Li, H. H., Chen, H. L., Chen, S. Y., Chen, Y. H., Lin, C. C., Tu, M. Y., & Chen, C. M. (2020). Kefir peptides alleviate high-fat diet-induced atherosclerosis by attenuating macrophage accumulation and oxidative stress in ApoE knockout mice. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65782-8>
- Ulusoy, B. H., Çolak, H., Hampikyan, H., & Erkan, M. E. (2007). An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. *Veterinary Medicine*, 37, 103–107.

- Vardjan, T., Mohar Lorbeg, P., Rogelj, I., & Čanžek Majhenič, A. (2013). Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2729–2736. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5829>
- Viana, R. O., Magalhães-Guedes, K. T., Braga, R. A., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2017). Fermentation process for production of apple-based kefir vinegar: microbiological, chemical and sensory analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.006>
- Vinderola, C., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E., & Matar, C. (2005). Distal mucosal site stimulation by kefir and duration of the immune response. *European Journal of Inflammation*, 3(2), 63–73. <https://doi.org/10.1177/1721727X0500300203>
- Vinderola, C., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E., & Matar, C. (2005). Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 72(2), 195–202. <https://doi.org/10.1017/S0022029905000828>
- Vujičić, I., Vulić, M., & Könyves, T. (1992). Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnology Letters*, 14(9), 847–850. <https://doi.org/10.1007/BF01029151>
- Walsh, A. M., Crispie, F., Kilcawley, K., O'Sullivan, O., O'Sullivan, M. G., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2016). Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage Kefir. *MSystems*, 1(5). <https://doi.org/10.1128/msystems.00052-16>
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., & Song, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(3), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011>
- Wang, Y., Xu, N., Xi, A., Ahmed, Z., Zhang, B., & Bai, X. (2009). Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(2), 341–347. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2012-x>
- Watterlot, L., Rochat, T., Sokol, H., Cherbuy, C., Bouloufa, I., Lefèvre, F., Grataudoux, J. J., Honvo-Hueto, E., Chlmonczyk, S., Blugeon, S., Corthier, G., Langella, P., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2010). Intra-gastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.037>
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., & Britz, T. J. (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15(4), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.07.016>
- Wszolek, M., Kupiec-Teahan, B., Skov Gul-dager, H., & Tamime, A. Y. (2007). Production of Kefir, Koumiss and other Related Products. In *Fermented Milks* (pp. 174–216). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995501.ch8>
- Xiao, J. Z., Kondo, S., Takahashi, N., Miyaji, K., Oshida, K., Hiramatsu, A., Iwatsuki, K., Kokubo, S., & Hosono, A. (2003). Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *Journal of Dairy Science*, 86(7), 2452–2461. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73839-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73839-9)
- Yap, W. B., Ahmad, F. M., Lim, Y. C., & Zainalabidin, S. (2016). *Lactobacillus casei* strain C1 attenuates vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 20(6), 621–628. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2016.20.6.621>
- Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpınar-Bayizit, A., & Sahin, S. (2016). The Antioxidative Capacity of Kefir Produced from Goat Milk. *International Journal of Chemical Engineering and*

- Applications, 7(1), 22–26. <https://doi.org/10.7763/ijcea.2016.v7.535>
- Yıldız-Akgül, F., Yetişemiyen, A., Şenel, E., & Yıldırım, Z. (2018). Kefir produced by secondary fermentation. *Mljekarstvo*, 68(3), 201–213. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2018.0305>
- Yusuf, D., Nuraida, L., Dewanti-Hariyadi, R., & Hunaefi, D. (2020). In Vitro Characterization of Lactic Acid Bacteria from Indonesian Kefir Grains as Probiotics with Cholesterol-Lowering Effect. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 726–732. <https://doi.org/10.4014/jmb.1910.10028>
- Zajšek, K., & Goršek, A. (2010). Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora. *Food and Bioprocess Technology*, 88(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.09.002>
- Zamperi, N. R., Abu, N., Mohamed, N. E., Nordin, N., Keong, Y. S., Beh, B. K., Zakaria, Z. A. B., Nik Abdul Rahman, N. M. A., & Alitheen, N. B. (2016). The Antimetastatic and Antiangiogenesis Effects of Kefir Water on Murine Breast Cancer Cells. *Integrative Cancer Therapies*, 15(4), NP53–NP66. <https://doi.org/10.1177/1534735416642862>
- Zamperi, N. R., Mohamad, N. E., Yeap, S. K., Ky, H., Beh, B. K., Liew, W. C., Tan, S. W., Ho, W. Y., Boo, S. Y., Chua, Y. H., & Alitheen, N. B. (2016). 16S Metagenomic Microbial Composition Analysis of Kefir Grain using MEGAN and BaseSpace. *Food Biotechnology*, 30(3), 219–230. <https://doi.org/10.1080/08905436.2016.1200987>
- Zhang, D. X., Kang, Y. H., Chen, L., Siddiqui, S. A., Wang, C. F., Qian, A. D., & Shan, X. F. (2018). Oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing OmpAI confers protection against *Aeromonas veronii* challenge in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 72, 552–563. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.043>
- Zhou, J., Zhu, P., Hu, X., Lu, H., & Yu, Y. (2018). Improved secretory expression of lignocellulolytic enzymes in *Kluyveromyces marxianus* by promoter and signal sequence engineering. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1232-7>
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Hashemi, M. (2014). The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefir whey protein by nanoparticle incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 109, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.018>
- Zongo, O., Cruvellier, N., Leray, F., Bideaux, C., Lesage, J., Zongo, C., Traoré, Y., Savadogo, A., & Guillouet, S. (2020). Physicochemical composition and fermentation kinetics of a novel Palm Sap-based Kefir Beverage from the fermentation of *Borassus aethiopum* Mart. fresh sap with kefir grains and ferments. *Scientific African*, 10, e00631. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00631>
- Zhou, J., Zhu, P., Hu, X., Lu, H., & Yu, Y. (2018). Improved secretory expression