

Chemical and microbiological characterization of Ecuadorian homemade water kefir Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano

Miguel Monar¹, Irene Dávalos¹, Sonia Zapata², Mario Caviedes¹, Lucía Ramírez-Cárdenas^{1,*}

¹Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias e Ingenierías - El Politécnico, Calle Diego de Robles y Vía Interoceánica, Cumbayá, Casilla Postal: 17-1200-841, Quito-Ecuador.

²Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales - COCIBA, Calle Diego de Robles y Vía Interoceánica, Cumbayá, Casilla Postal: 17-1200-841, Quito-Ecuador.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: lramirez@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 05/03/2014. Aceptado/Accepted: 20/03/2014.

Publicado en línea/Published on Web: 13/06/2014. Impreso/Printed: 13/06/2014.

Abstract

Water kefir is a homemade fermented drink, to which certain probiotic properties are attributed. In this study, changes in acidity and °Brix of Ecuadorian homemade water kefir, elaborated with three different types of sweeteners (brown sugar, honey and granulated sugar) and at different fermentation times (24, 48 and 72 hours), were determined. The treatments arranged in a completely randomized block design (factorial 3²) was applied. A focus group evaluated and selected three prototypes due to their sensory characteristics, also acidity and °Brix were measured for chemical specifications. According to the weighting of the variable of response for microbiological count, two treatments were chosen. The treatment with the greatest acceptance due to their chemical, microbiological and sensory characteristics was the sample fermented with honey at 48 h. A phenotypic and genotypic characterization (16S DNAr) of microbiota showed the presence of *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*, which could be attributed to water kefir probiotic properties.

Keywords. water kefir, 16S DNAr, fermentation, probiotics

Resumen

El kéfir de agua es una bebida fermentada elaborada de forma casera a la cual se le atribuye ciertas propiedades probióticas. En este estudio se determinaron los cambios de acidez y °Brix del Kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano, elaborado con tres tipos de endulzantes (panela, miel de abeja y azúcar blanca granulada), a diferentes tiempos de fermentación (24, 48 y 72 horas), siendo los tratamientos dispuestos en el diseño en bloques completamente al azar, con arreglo factorial 3². Un grupo focal evaluó los prototipos y seleccionó tres debido a sus características sensoriales, midiéndose también la acidez y °Brix para obtener las especificaciones químicas. De acuerdo a la ponderación de las variables de respuesta se escogieron dos tratamientos para recuento microbiano. El tratamiento con mayor aceptación debido a sus características químicas, microbiológicas y sensoriales fue el de miel de abeja a las 48 h de fermentación. La caracterización fenotípica y genotípica (ADNr 16S) de la microbiota indicó la presencia de *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Saccharomyces cerevisiae* lo que podría conferir características probióticas al kéfir de agua.

Palabras Clave. kéfir de agua, ADNr 16S, fermentación, probióticos

Introducción

El kéfir de agua o kéfir azucarado es una bebida fermentada consumida de forma casera principalmente en México y Brasil. Es elaborado a base de una solución de sacarosa, generalmente entre 3 y 10%; frutas frescas, principalmente limones; frutas secas como higos y un inóculo de microorganismos denominado “tíbcos” o

“tibi” [1]. Los tíbcos son gránulos similares a una coliflor, con un diámetro promedio de 5 a 20 mm, apariencia transparente y estructura elástica [2]. Producto de la fermentación durante uno o dos días a temperatura ambiente se obtiene una bebida carbonatada ligeramente coloreada, con sabor levemente ácido por la producción de ácido láctico y ácido acético, poca concentración de azúcar y una ligera cantidad de alcohol [3], que no llega

ISSN 1390-5384



a superar el 2 % (v/v) [4].

El origen de los gránulos de kéfir de agua es aún incierto. Existen algunas descripciones de gránulos similares llamados “plantas de cerveza de jengibre” que soldados ingleses importaron de la guerra de Crimea en 1855 [2]. Así mismo, se reportaron “granos Tibi” de origen mexicano relacionados con el cactus (*Opuntia*) de donde los gránulos eran removidos de las hojas. Son varios los nombres con los que se les conoce a los tísticos, como: “abejas de California”, “abejas Africanas”, “nueces de cerveza”, “balm of gilead” y “semillas japonesas de cerveza”. Finalmente fueron denominados “granos de kéfir azucarado” con el fin de distinguirlos del kéfir de leche [2].

En general, la microbiota del kéfir de agua está compuesta por una estructura de polisacárido dextrinado insoluble en agua, en donde viven en simbiosis bacterias acidolácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras. El polisacárido es un polímero de glucosa con enlaces α 1-6. Se ha identificado al *Lactobacillus hilgardii* como la principal bacteria encargada de la producción del polímero, por medio de la enzima glicosiltransferasa [2]. La simbiosis entre levaduras y bacterias en los “tísticos” ocurre debido a que el crecimiento de las levaduras se produce por la acidificación del medio creado por las bacterias; mientras que el crecimiento de las bacterias es estimulado por la producción de factores de crecimiento (vitaminas) y compuestos nitrogenados solubles por parte de las levaduras [4].

Los microorganismos presentes en cada gránulo de kéfir azucarado o kéfir de agua dependen de la región, así como del país de origen. Un estudio realizado en Brasil comparó los microorganismos presentes en los gránulos de kéfir provenientes de diferentes regiones del país. Se encontraron diferencias en la composición de la microbiota del gránulo según su lugar de origen; sin embargo, el impacto del clima, medios y métodos de cultivo permanecen desconocidos [1].

Las bacterias acidolácticas (BAL) envuelven a tres géneros tradicionales *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Sin embargo, se incluye también a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* [5]. Son bacilos o cocos Gram-positivos asporógenos, producen ácido láctico a partir de hexosas, en su mayoría son aerotolerantes que carecen de citocromos y porfirinas, por lo que son catalasa y oxidasa negativa [6], crecen dentro de un rango de de pH de 4.0 a 4.5; y según su metabolismo se dividen en homofermentativas y heterofermentativas [5]. Algunos beneficios para la salud son atribuidos a las BAL como la inhibición de patógenos, lo cual puede ser el resultado de la producción de diferentes ácidos y metabolitos como ácido láctico y ácidos orgánicos similares, peróxido de hidrógeno y bacterosinas así como diacetil y CO_2 [6].

En un estudio se observó que las bacterias acidolácticas estimulaban el sistema inmune, aumentando el número de macrófagos, linfocitos, inmunoglobulina A (IgA) y

Ingredientes	Cantidad
Agua	300.0 mL
Endulzante	22.5 g
Tísticos	18.0 g

Tabla 1: Formulación del kéfir de agua.

la producción de interferón gamma. Estos efectos ayudaban a mejorar la resistencia del hospedador frente a la colonización de microorganismos patógenos [5].

El presente estudio tuvo como objetivos determinar las características químicas adecuadas para la posible industrialización del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano y caracterizar fenotípica y genotípicamente los microorganismos presentes en la bebida.

Elaboración del kéfir de agua

A partir de una formulación base [7] (Tabla 1), se modificó el tipo de endulzante y el tiempo de fermentación. Este experimento se ejecutó bajo un diseño en bloques completamente al azar con un arreglo factorial 3^2 correspondiente a la combinación de dos factores con tres niveles cada uno: tipo de endulzante (miel de abeja, azúcar y panela) y tiempo de fermentación (24, 48 y 72 horas), con tres repeticiones, obteniéndose nueve tratamientos, y un total de 27 unidades experimentales. Las variables de respuesta fueron: acidez y grados Brix.

Análisis Físico-Químicos

El grupo focal realizado con 6 personas (3 hombres y 3 mujeres), determinó las características requeridas para la bebida, siendo: Acidez intermedia (entre 5 % y 9 % de ácido láctico) y menor $^{\circ}\text{Brix}$ (a menor cantidad de sólidos solubles presentes en la bebida existe mayor fermentación). Acidez y $^{\circ}\text{Brix}$ fueron analizados según los métodos descritos por Lees [8].

La ponderación de las variables permitió encontrar los mejores tratamientos, asignándose 1 a la acidez y 2 a los $^{\circ}\text{Brix}$.

Análisis Microbiológicos

Se pesó 20 g de la muestra y se diluyó en 180 mL de citrato de sodio al 2 %. A continuación se preparó una serie de diluciones decimales adicionales [9], para lo cual se tomó 1 mL de la primera dilución y se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de solución de citrato de sodio al 2 %, se obtuvo la dilución de 10^{-2} , repitiéndose este procedimiento hasta obtener a una dilución de 10^{-6} .

Recuento de Bacterias ácido lácticas (BAL)

Se colocó 0.1 mL de cada dilución en los medios MRS (Man, Rogosa y Sharpe) que es un agar selectivo para *Lactobacillus spp.* y medio M17 que promueve el crecimiento de cocos Gram positivos (*Pediococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*) y se incubó en una atmósfera micro-aerófila (5 % de CO_2) a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

Fuentes de Variación	G.L.	Cuadrados Medios	
		° Brix	Acidez (% ácido láctico)
Total	26		
Bloques	2	0.0033 ^{n.s.}	0.4535 ^{n.s.}
Tratamientos	8	1.1300*	63.8969*
Tiempo de fermentación (A)	2	0.2211*	65.3469*
Tipo de endulzante (B)	2	4.2700*	165.7454*
Interacción A x B	4	0.0144*	12.2477*
Error	16	0.0033	0.1363

*Significativo al 5 % de probabilidad por la prueba F.

n.s. No significativo al 5 % de probabilidad por la prueba F.

Tabla 2: Resumen del análisis de Varianza (ANOVA) de °Brix y acidez expresada en porcentaje de ácido láctico de los tratamientos.

Se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (ufc) a las 48 horas siguiendo el método del libro "The Compendium of Methods for the Microbial Examination of Foods" [10].

Recuento e identificación de levaduras

Se extendió 0.1 mL de cada dilución en el medio Saboraud con 4 % de glucosa. La incubación se realizó en condiciones aeróbicas a temperatura ambiente. Se contaron las colonias al segundo día de incubación. La identificación de levaduras fue realizada mediante la galería API Candida (Biomérieux, Francia).

Análisis molecular

Extracción de ADN

Se aislaron algunas colonias con diferentes morfologías de los medios MRS y M17. Cada cepa se volvió a aislar en medio MRS o M17 y se trasladaron 3 a 10 colonias a tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían 300 μ L de agua estéril y se sometió a ebullición durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 3 minutos, se mezcló con glicerol y se congeló para ser utilizado posteriormente [10].

Amplificación del ADNr 16S

Para la amplificación del ADNr 16S (1500 pb) se utilizaron primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') [11]. Se preparó una reacción que contenía 10 μ L de ADN, Buffer 1X (Promega), MgCl₂ (0.25 mM), dNTP's (0.2 μ M) 0.2 μ M de cada primer, 0.6 U GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison USA), y agua para completar 50 μ L. Las condiciones de amplificación fueron: después de una denaturación inicial a 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos (94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s, 72 °C por 30 s) y una extensión final a 72 °C por 10 min. Todos los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1 % y 0.01 % de bromuro de etidio. Posteriormente fueron enviados para secuenciación en ambas direcciones a la empresa Functional Biosciences, Madison, Wisconsin-USA.

Análisis Químicos

Según la Tabla 2 existió una diferencia significativa entre los tratamientos para las dos variables. Igualmente tanto el tiempo de fermentación como el tipo de endulzante y su interacción afectaron significativamente a los °Brix y acidez de los tratamientos. Por otro lado, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los bloques.

El Coeficiente de Variación de los °Brix fue de 0.94 % y de la acidez 6.53 %. Según [12] para ensayos realizados en laboratorios o invernaderos se consideran valores aceptables los cercanos al 5 %.

Los tratamientos 4, 5 y 6 (miel de abeja a las 24, 48 y 72 horas) fueron estadísticamente iguales (Tabla 3) y presentaron la menor cantidad de °Brix, siendo los mejores.

En la Figura 1 se presentan los cambios en los °Brix de los tres tipos de endulzantes durante 72 horas de fermentación, observándose una disminución conforme aumentaba el tiempo de fermentación, debido a que las bacterias presentes utilizan glucosa y fructosa como fuente de energía. Un estudio sobre el kéfir de agua mostró que el contenido de sólidos solubles (°Brix) se redujo al final de la fermentación [4].

La Tabla 3, también muestra que los tratamientos 4 y 5, (miel de abeja a las 24h y 48h respectivamente), fueron

Tratamientos	°Brix *	Acidez (% de ácido láctico)*
7	6.80 a	0.71 d
8	6.77 a	0.86 d
9	6.63 ab	1.71 cd
1	6.63 cb	3.14 cd
2	6.40 c	4.85 cd
3	6.13 d	10.83 a
6	5.57 e	13.11 a
5	5.40 e	9.89 ab
4	5.23 e	5.82 cb

*Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5 % de probabilidad por la prueba de Tukey.

Tabla 3: Grados Brix y acidez de los tratamientos

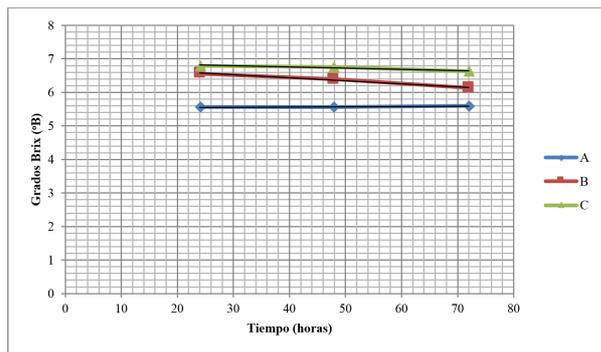


Figura 1: Cambio de los grados Brix a lo largo del tiempo (horas). A: miel de abeja. B: panela. C: azúcar.

estadísticamente iguales y tuvieron una acidez intermedia en comparación al resto de tratamientos, cumpliendo la especificación requerida.

En la Figura 2 se presentan los cambios en la acidez de los tres tipos de endulzantes durante 72 horas de fermentación, ocurriendo un incremento al transcurrir el tiempo de fermentación para los tres tipos de endulzantes. Las bacterias del género *Leuconostoc* tienen la capacidad de producir ácido láctico como metabolito principal a partir de glucosa y fructosa [13]. Este género se encontró en cantidades considerables en estudios de caracterización del kefir de agua [4, 14].

Así mismo, se observó que los tratamientos formulados a base de miel de abeja fueron los que tuvieron mayor porcentaje de ácido láctico, lo que puede ser debido a que la miel de abeja contiene 29 % de glucosa y 38 % de fructosa en su composición y solo un 4 % de sacarosa [15], de esta manera las bacterias tienen mayor disponibilidad de sustrato para la formación de ácido láctico. En el caso de la panela, el porcentaje de azúcares reductores es de 9.15 % y de sacarosa 80.91 % [16]; mientras que, el porcentaje de azúcares reductores del azúcar blanca granulada es de 0.04 % [17]. La panela como el azúcar tienen menor disponibilidad de sustrato, por lo tanto la producción de ácido láctico podría ser menor en comparación a la miel de abeja.

Con la ponderación de las variables de respuesta los mejores tratamientos fueron miel de abeja a las 24 y 48 horas de fermentación al obtener el mayor puntaje. En estos dos tratamientos se realizaron recuentos de bacterias ácidolácticas y levaduras. El tratamiento con un número mayor a 10^6 ufc/mL fue seleccionado para la caracterización microbiológica [18–20].

Análisis Microbiológicos

Para determinar las condiciones óptimas de crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) se cultivó en los medios MRS y M17 bajo condiciones aeróbicas y microaerófilas (5 % de CO_2) a 37°C (Tabla 4). Los recuentos mostraron que las condiciones óptimas para el crecimiento de BAL en los dos medios fueron en ambiente micro-aerófilico a 37°C . La Condición 2 fue seleccionada como mejor tratamiento debido a que mostró los recuentos más altos.

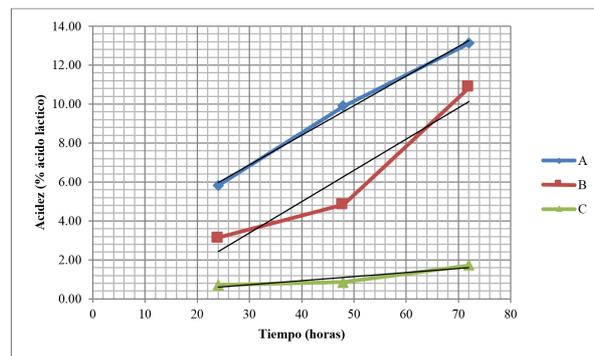


Figura 2: Cambio de la acidez (% de ácido láctico) a lo largo del tiempo (horas). A: miel de abeja. B: panela. C: azúcar.

Los recuentos de bacterias ácido lácticas y levaduras realizados por triplicado indicaron que el tratamiento 2 contenía entre $3,2 \times 10^9$ y $4,1 \times 10^9$ ufc BAL/mL, siendo recuentos superiores a la cantidad mínima requerida para que un alimento sea considerado probiótico (10^6 ufc/mL) [18, 19]. Por otro lado, el recuento de levaduras (2.8×10^7 ufc/mL) estuvo por debajo de lo recomendado para alimentos probióticos 1×10^{10} ufc/mL) (Tabla 5).

Las secuencias analizadas mostraron niveles altos de homología con *Leuconostoc citreum* JQ712017.1, *Leuconostoc holzapfelii* NR_042620.1, *Leuconostoc pseudomesenteroides* AB598984.1 y *Leuconostoc mesenteroides* JQ712026.1. El árbol obtenido por el método de Neighbor-joining (Figura 3), permitió identificar las secuencias obtenidas como *Leuconostoc holzapfelii* (5 cepas) y *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1 cepa).

La identificación fenotípica de las levaduras indicó que se trata de *Saccharomyces cerevisiae*.

Leuconostoc holzapfelii es un cocobacilo Gram-positivo que produce ácido láctico y CO_2 a partir de glucosa y fructosa y se le ha encontrado asociado con la microbiota de la fermentación del café etíope y en masas fermentadas a partir de harina de trigo sarraceno (planta originaria de Asia central) y Teff (herbácea cultivada principalmente en Etiopía) [13, 21]. Adicionalmente, un estudio identificó a *Leuconostoc pseudomesenteroides* en pozol (bebida fermentada, ácida, no alcohólica a base de maíz de origen Maya) a la cual se le atribuye beneficios como el control de diarreas, disminución de fiebre, entre otros [22]. Por otro lado, se determinó la presencia de *L. pseudomesenteroides* en alimentos fermentados como cassava fermentada elaborada en Benin, queso elaborado en India, leche fermentada elaborada en Kenia [23], Nukadoko (tipo de arroz utilizado para la elaboración de Nukazuke, encurtido elaborado en Japón) [24], jugo de caña [25] y quesos artesanales elaborados a partir de leche no pasteurizada [26].

El género *Leuconostoc* es uno de los microorganismos utilizados como probiótico en conjunto con otras bacterias ácido lácticas de los géneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y levaduras del género *Saccharomyces* [27, 28]. En un estudio sobre el Pulque (bebida fermentada mexicana, no

Condición	Recuento de BAL en MRS		Recuento de BAL en M17	
	ufc/mL		ufc/mL	
	Aeróbico	Micro-aerofílico	Aeróbico	Micro-aerofílico
1	1.5×10^4	2.1×10^4	1.0×10^4	$>2.5 \times 10^5$
2	2.1×10^4	$>2.0 \times 10^5$	2.0×10^4	$>2.5 \times 10^5$

Tabla 4: Recuentos de bacterias ácido lácticas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas a 37 °C para los tratamientos 1 y 2

Número de ensayos	Recuento de BAL	Recuento de BAL	Recuento de levaduras
	<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Lactobacillus spp</i>	
	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL
1	3.2×10^9	4.1×10^9	2.8×10^7
2	3.2×10^9	4.2×10^9	2.8×10^7
3	3.3×10^9	4.1×10^9	2.8×10^7
Promedio	3.2×10^9	4.1×10^9	2.8×10^7

Tabla 5: Recuentos de bacterias ácido lácticas y levaduras del kefir de agua artesanal

alcohólica, no destilada y elaborada a partir de la fermentación de varias especies de Agave) se encontró la presencia de *Leuconostoc spp.* con importante actividad antimicrobiana *in vitro* en contra de *Escherichia coli* EPEC 2348/69, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhi y *S. enterica* serovar Typhimurium. Mientras que *in vivo*, disminuyó la capacidad de infección de *S. enterica* serovar Typhimurium L1334 lo que podría sugerir propiedades antimicrobianas. Sin embargo, se recomienda realizar ensayos *in vivo*, así como estudios clínicos y epidemiológicos con el fin de establecer la capacidad de colonización, adherencia al intestino, resistencia a pH bajo y sales biliares de las cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Leuconostoc hozapfeli* indentificadas en el kefir de agua.

Saccharomyces cerevisiae ha sido aislado de varios alimentos, bebidas alcohólicas y leches fermentadas de África tales como; “kenkey” (Ghana), “Mawe” (Benin), “Masa” (Nigeria), “Munkoyo” (Zambia), “Busaa” (Kenya), “Chikokivana” (Zimbabwe), “Amasi” (Zimbabwe) “Mbanik” (Senegal), “Nono” (Nigeria), entre otros [29]. Produce alcohol y otros componentes aromáticos como ésteres y ácidos orgánicos a partir de carbohidratos. Además se identificó que cinco cepas de *S. cerevisiae* fueron capaces de sobrevivir al bajo pH del estómago y al pH del tracto intestinal lo que les convierte en posibles probióticos [30]. Por otro lado, aporta “flavor” a los productos fermentados y puede coexistir con otros tipos de microorganismos como bacterias ácido lácticas. Es posible que esta levadura además aporte al valor nutricional de alimentos fermentados, al estar asociada con producción de vitamina B12 y algunos aminoácidos [29]. En otro estudio realizado en Pulque, se aislaron grupos microbianos de los géneros: *Zymomonas*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces* que han sido reportados como microorganismos con posible efecto probiótico [31]. Asimismo, se ha reportado el uso de cepas de *S. cerevisiae* y *S. bulgardi* en la prevención de varios tipos de diarrea y colitis en humanos [30].

Conclusiones

Se logró establecer las características químicas adecuadas para la industrialización y comercialización del kefir de agua. Al utilizar miel de abeja como sustrato para la fermentación se obtuvieron valores de acidez apropiados según la preferencia de los consumidores, además se redujo el contenido de grados Brix inicial, lo que es un indicador de fermentación.

La concentración de bacterias acidolácticas presentes en el kefir de agua ecuatoriano fue de 4×10^9 ufc/mL, y el recuento de levaduras fue de 3×10^7 ufc/mL. Por lo tanto, la bebida podría ser considerada probiótico debido a que excede la cantidad mínima de bacterias ácido lácticas requeridas (10^6 ufc/mL). Sin embargo, la cantidad de levaduras fue menor a la cantidad requerida para ejercer el efecto probiótico.

La caracterización fenotípica y molecular de la microbiota del Kefir mostró la presencia de *Leuconostoc Hozapfelii*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Saccharomyces cerevisiae*.

De acuerdo con algunos estudios, tanto *Leuconostoc* como *Saccharomyces* aportan con propiedades benéficas para la salud por tanto, es posible que esta bebida pueda ejercer un efecto probiótico en los consumidores [27, 28, 30, 31].

Agradecimientos

Al Departamento de Ingeniería de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, por el uso de sus instalaciones, equipos, materiales y reactivos, y particularmente a Javier Garrido y Carolina Andino. A su vez, al Laboratorio de Microbiología por la prestación de materiales y reactivos, y la colaboración de Carolina Proaño. Finalmente un agradecimiento a Paola Carrillo y Juan Daniel Mosquera por la revisión de la bibliografía.

Referencias

- [1] Miguel, M.; Cardoso, P.; Magalhães, K.; Schwan, R. 2011. “Profile of microbial communities present in ti-

- bico (sugary kefir) grains from different Brazilian States". *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 27(1):1875–1884.
- [2] Waldherr, F.; Doll, V.; Meissner, D.; Vogel, R. 2010. "Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir". *Food Microbiology*, 27(5):672–678.
- [3] Gulitz, A.; Stadie, J.; Wenning, M.; Ehrmann, M.; Vogel, R. 2011. "The microbial diversity of water kefir". *International Journal of Food*, 151(3):284–288.
- [4] Teixeira, M.; Pereira, G.; Dias, D.; Freitas, R. 2010. "Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir". *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 26(7):1241–1250.
- [5] Jay, J. 1994. "Microbiología moderna de los alimentos". *Acribia S.A.: Zaragoza*.
- [6] Adams, M.; Moss, M. 1997. "Microbiología de los alimentos". *Acribia S.A.: Zaragoza*.
- [7] Ebookbrowse. s.f. 2011. "Kéfir de agua". *Enlace: <http://ebookbrowse.com/kefir-de-agua-pdf-d53056391>*. Fecha de consulta: 31 de Octubre de 2011.
- [8] Lees, R. 1982. "Análisis de los alimentos". *Acribia S.A.: Zaragoza*.
- [9] Camacho, A.; Giles, M.; Ortegón, A.; Ortegón, M.; Serrano, B.; Velázquez, O. 2009. "Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis". *Facultad de Química, UNAM*.
- [10] Merck. "Microbiology Manual".
- [11] Martin-Laurent, F.; Philippot, L.; Hallet, S.; Chaussod, R.; Germon, J.; Soulas, G.; Catroux, G. 2011. "DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods". *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5):2354–2359.
- [12] Sanchez-Otero, J. 2008. "Introducción al Diseño Experimental". *Quito: INGELSI*.
- [13] De Bruyne, K.; Schillinger, U.; Caroline, L.; Boehringer, B.; Cleenwerck, I.; Vancanneyt, M.; De Vuyst, L.; Franz, C.; Vandamme, P. 2007. "*Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12):2952–2959.
- [14] Waldherr, F.; Doll, V.; Meissner, D.; Vogel, R. 2010. "Identification and characterization of a glucan-reducing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir". *Food Microbiol*, 27(5):672–678.
- [15] Zandamela, E. 2008. "Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique". *Universidad Autónoma de Barcelona, Tesis Doctoral: Barcelona*.
- [16] Bressani, R. 2012. *Instituto de Nutricion de Centro América y Panamá INCAPI*.
- [17] Kirk, R.; Sawyer, R.; Egan, M. 2004. "Composición y análisis de los alimentos de Pearson". *Editorial Continental: Mexico D.F.*
- [18] Sanz, Y.; Collado, M.; Dalmau, J. 2003. "Probióticos: Criterios de Calidad y Orientaciones para el Consumo". *Acta Pediátrica Española*, 61(9):58–64.
- [19] Olagnero, G.; Abad, A.; Bendersky, S.; Genevois, C.; Granzella, L.; Montonati, M. 2007. "Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos". *DIAETA: Buenos Aires*.
- [20] Shobharani, P.; Renu, A. 2011. "A Potent Probiotic Strain from Cheddar Cheese". *Indian Journal of Microbiology*, 3(51):251–258.
- [21] Moroni, A.; Arendt, E.; Dal Bello, F. 2011. "Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs". *Food Microbiology*, 3(28):497–502.
- [22] Rodríguez, A. 2011. "XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería".
- [23] Oguntoyinbo, F.; Huch, M.; Cho, G.; Schillinger, U.; Holzapfel, W.; Sanni, A.; Franz, C. 2010. "Diversity of bacillus species isolated from okpehe, a traditional fermented soup condiment from Nigeria". *Journal of Food Protection*, 73(5):870–878.
- [24] Sawa, N.; Okamura, K.; Zendo, T.; Himeno, K.; Nakayama, J.; Sonomoto, K. 2009. "Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* QU 15". *Journal of Applied Microbiology*, 109(1):282–291.
- [25] Dong-Wook, K.; Sang-Haeng, C.; Aram, K.; Seong-Hyeuk, N.; Ryong, N.; Aeri, K.; Dae-Soo, K.; Hong-Seog, P. 2011. "Genome Sequence of *Leuconostoc pseudomesenteroides* KCTC 3652". *Journal of Bacteriology*, 193(16):4299.
- [26] Van Hoorde, K.; Van Leuven, I.; Dirinckx, P.; Heyndrickx, M.; Coudijzerd, K.; Vandamme, P. 2010. "Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses". *International Journal of Food Microbiology*, 2(144):226–235.
- [27] Amores, R.; Calvo, A.; Maestre, J.; Martínez-Hernández, D. 2004. "Probióticos". *Revista Española de Quimioterapia*, 2(17):131–139.
- [28] Ramírez, J.; Ulloa, P.; Velázquez González, M.; Ulloa, J.; Arce Romero, F. 2011. "Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud". *Revista Fuente Año*, 7:1–16.
- [29] Jespersen, L. 2003. "Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages". *FEMS, Yeast Research*, 3(2):191–200.

- [30] Pennacchia, C.; Blaiotta, G.; Pepe, O.; Villani, F. 2008. "Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics". *Journal of Applied Microbiology*, 6(105):1919–1928.
- [31] Cervantes-Contreras, M.; Pedroza-Rodríguez, A. 2007. "El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia". *Raman. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 5(8):101–212.