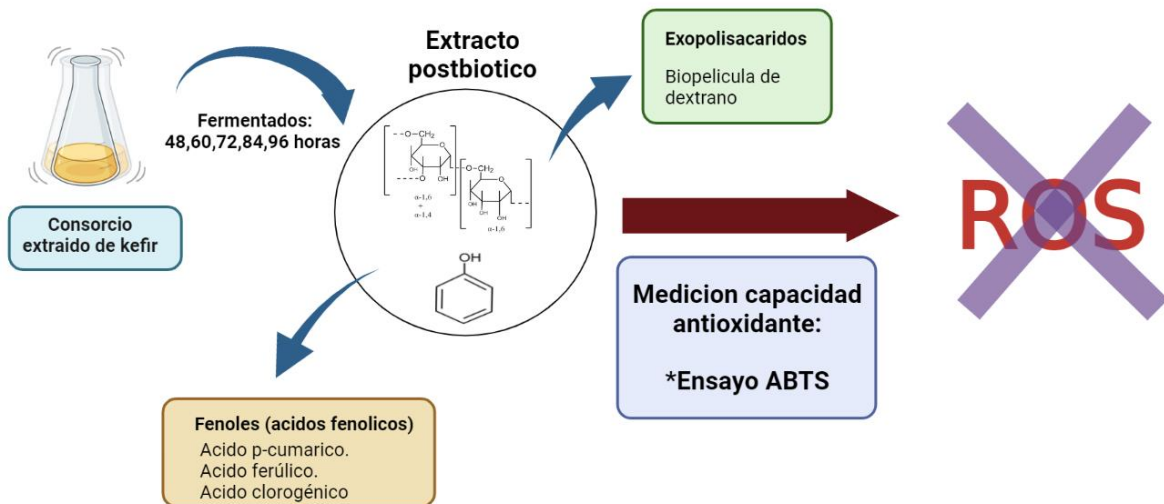


Actividad antioxidante de un consorcio microbiano derivado de kéfir de agua: validación de su funcionalidad postbiótica



Actividad antioxidante de un consorcio microbiano derivado de kéfir de agua: validación de su funcionalidad postbiótica

David Fernández Trujillo

Asesora:

Maria Clara Arrieta Echeverri

Co-asesora:

Laura Sierra Zapata

Escuela de Ciencias Aplicadas e Ingeniería
Departamento de Ciencias Biológicas
Universidad EAFIT

Mayo de 2022

Resumen

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son compuestos altamente reactivos con gran capacidad oxidativa, que cuando se acumulan en cantidades significativas causan daños a la salud humana, desde los tejidos hasta los genes. Los antioxidantes son compuestos naturales y artificiales, capaces de contrarrestar los efectos de las ROS. Una de las fuentes naturales de estas sustancias antioxidantes es el kéfir, una bebida fermentada basada en leche o agua con adición de azúcares. De una variante de kéfir base agua, se extrajo un consorcio microbiano con intereses de ser comercializado como un producto beneficioso para la salud, tipo probiótico y postbiótico. Dentro de la función postbiótica, es recurrente hablar de capacidades antioxidantes y aunque existen varios estudios que comprueban los beneficios antioxidantes del kéfir, este conjunto de cepas específico no ha sido estudiado aún y su capacidad antioxidante no está determinada. Adicionalmente, las diferentes etapas de crecimiento microbiano de dicho consorcio presentan variaciones metabólicas y composicionales donde pueden existir diferentes actividades de neutralización de ROS. Este consorcio derivado del kéfir fue analizado entonces, en varios tiempos de fermentación, con el fin de comprobar sus capacidades antioxidantes dentro de la porción postbiótica. Se obtuvieron extractos crudos (porción postbiótica) a lo largo de la fermentación (48, 60, 72, 84, 96h) y se determinó su capacidad antioxidante por el método de evaluación del potencial de barrido de radicales, ABTS. Los valores del poder antioxidante identificados estadísticamente en los mejores tiempos de fermentación (de 72 a 96 horas) fueron comparados con el método de análisis antioxidante equivalente Trolox (TEAC) y su capacidad antioxidante fue expresada en términos de éste, obteniendo que, el TEAC de 72 horas en adelante, mostraron ser 1.5 veces mayores a las medidas del medio de cultivo.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive compounds with high oxidative capacity, which in significant quantities cause damage to human health, from tissue damage to genetic disturbances. Antioxidants are natural and artificial compounds capable of counteracting the effects of ROS. One of the natural sources of these antioxidant substances is kefir, a fermented beverage based on milk or water with added sugars. From a variant of water-based kefir, a microbial consortium was extracted with potential of being marketed as a beneficial product for health in the probiotic and postbiotic categories. Within the postbiotic function, it is recurrent to talk about antioxidant capacities and although there are several studies that prove the antioxidant benefits of kefir, this group of strains has not been yet studied and its antioxidant capacity hasn't been determined. Additionally, different stages of microbial fermentation of this consortium present metabolic and compositional variations where different ROS could be neutralizing oxidative activities. This kefir-derived consortium was then analyzed, at various fermentation times, to check its antioxidant capacities within the postbiotic portion. Crude extracts (postbiotic portion) were obtained throughout the fermentation (48, 60, 72, 84, 96h) and their antioxidant postbiotic capacity was determined by the radical scavenging potential evaluation method, ABTS. The best fermentation times identified by statistical analysis (from 72 to 96 hours of fermentation) were compared with the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and their antioxidant capacity was

expressed in terms of it, finding that, the TEAC from 72 hours onwards, showed to be 1.5 times higher than the measurements of the culture medium.

Contenido

Resumen.....	3
Abstract.....	3
1. Introducción.....	7
1.1. Especies reactivas de oxígeno.....	7
1.2. Probióticos.....	7
1.3. Consorcios microbianos provenientes del kéfir y su porción postbiótica.	8
1.4. Composición microbiana general del Kéfir y posibles metabolitos contribuyentes a la capacidad postbiótica antioxidante.	8
1.5. Productos de kéfir y mercado potencial.	9
2. Justificación y Objetivos:	9
2.1. Justificación	9
2.2. Objetivo:.....	10
2.3. Objetivos específicos	10
3. Metodología.....	10
3.1. Condiciones de fermentación de cultivo y fermentado.	10
3.2. Filtrado y purificación.....	10
3.3. Dilución de los extractos.	10
3.4. Evaluación del potencial de barrido de radicales por el método ABTS.....	11
3.5. Selección del tiempo de fermentación con mayor capacidad antioxidante	11
3.6. Preparación de antioxidante trolox.....	12
3.7. Cálculo del IC50 de extractos y trolox.....	12
1.1. Evaluación del mejor tiempo de fermentación en términos de capacidad antioxidante equivalente trolox	13
2. Resultados.	13
2.1. Análisis cualitativo de la capacidad inhibitoria en los diferentes tiempos de fermentado de kéfir de agua.	13
2.2. Mayor capacidad antioxidante en la dilución 25% v/V según el tiempo de fermentación del kéfir de agua.	14
2.3. Análisis de capacidad antioxidante medida en equivalente Trolox.....	15
3. Discusión.....	16
4. Conclusiones y recomendaciones.....	20

5. Referencias.....21

1. Introducción

1.1. Especies reactivas de oxígeno

Las ROS o especies reactivas de oxígeno son compuestos altamente inestables debido a que, en su estructura poseen uno o dos electrones desapareados y separados en distintas órbitas de la capa externa del electrón, lo que los vuelve altamente reactivos (Held & BioTek Instruments, 2015). Aunque son producidos naturalmente en los procesos metabólicos y pueden jugar papeles importantes en señalización celular o en homeostasis, su acumulación es perjudicial y causa daños internos en las células y tejidos, propiciando daños en el material genético (DNA y RNA) donde termina causando mutaciones que derivan en inflamación desmesurada o cáncer (Ray et al., 2012). Otras formas en las que estas especies pueden afectar el cuerpo son por medio de la oxidación de ácidos grasos polinsaturados y proteínas además de la inactivación de enzimas o cofactores que pueden desencadenar un gran número de desórdenes metabólicos (Burton & Jauniaux, 2011). Los desórdenes en la producción de estas especies son principalmente por estrés externo e interno; entre las causas de estrés destacan la exposición a sustancias tóxicas, los rayos UV, la mala alimentación, el humo de cigarrillo y la contaminación ambiental (Devasagayam et al., 2004). A este proceso se le conoce como estrés oxidativo, promoviendo la formación de radicales libres y peróxidos (Held 2015). Por ende, tratamientos que contrarresten la formación desmesurada de estas especies prueba ser un foco importante de investigación, teniendo como una posible respuesta a esto, la búsqueda y producción de productos probióticos que, en su porción postbiótica, puedan contrarrestar el efecto de las ROS.

1.2. Probióticos.

La organización mundial de la salud define a los probióticos como microorganismos con potencial para beneficiar la salud de un huésped, siempre y cuando sea administrado en cantidades adecuadas (Hill et al., 2014). El efecto probiótico se debe principalmente a algún producto metabólico producido por dichos microorganismos y puede tener diversos efectos benéficos en el huésped, tales como: La mejoría de la absorción proteica y la utilización de esta (Jäger et al., 2018), la inhibición de aflatoxinas (micotoxinas provenientes de hongos que presentan uno de los mayores desafíos en la sanidad alimenticia ingeridas en alimentos contaminados) (Afshar et al., 2020), la capacidad de otorgar inmunidad al cuerpo frente a diferentes patógenos (He et al., 2011), actividades de regulación de pH intestinal (Darbandi et al., 2019) y capacidades inmunomoduladoras y antiinflamatorias (He et al., 2011). En general, se percibe que los probióticos otorgan una mejoría a la salud general del huésped a través de estos mecanismos mencionados. Se ha incluso demostrado que tienen propiedades anticancerígenas (Rahbar Saadat et al., 2020) y antioxidantes (Xu, Shang, et al., 2011).

1.3. Consorcios microbianos provenientes del kéfir y su porción postbiótica.

El consorcio microbiano evaluado en este trabajo es derivado de kéfir y es propiedad de una empresa aliada del departamento de Ciencias Biológicas EAFIT. El kéfir es una bebida fermentada, originaria de Europa de este, precisamente en las cordilleras del Cáucaso (Prado et al., 2015). Esta bebida es fermentada tanto en productos lácteos (kéfir de leche) como en bebidas azucaradas basadas en agua, como la melaza, el licor de maíz o el agua panela (kéfir de agua) (Luang-In & Deeseenthum, 2016; Plessas et al., 2017; Prado et al., 2015). El kéfir ha sido estudiado y reconocido por sus propiedades probióticas como: capacidad antiinflamatoria, capacidades inmunomoduladora, actividades antimicrobianas, propiedades anticancerígenas, anti mutagénicas (Diniz et al., 2003; Guzel-Seydim et al., 2011; Silva et al., 2009) y siendo el foco de este estudio, capacidades antioxidantes (Bensmira & Jiang, 2015; Jaradat et al., 2013; Luang-In & Deeseenthum, 2016; Yilmaz-Ersan et al., 2018). Estas propiedades del kéfir no son necesariamente producidas por un microorganismo singular, debido a que, como en muchos otros nichos ecológicos, estos microorganismos son congregaciones que coexisten entre sí, llamados consorcios microbianos (Clark et al. 2009). Las congregaciones pueden presentar propiedades probióticas específicas y diferentes a las de una cepa que constituya un probiótico individual (Kushugulova et al. 2014). Estas permiten una mayor complejidad y eficiencia en la producción de ciertos metabolitos debido a que, en conjunto, los diferentes microorganismos aportan de diversas formas al funcionamiento de la comunidad y la supervivencia de la misma (Clark et al. 2009). Estos metabolitos con efectos positivos para la salud que son resultantes de los procesos de fermentación, son también conocidos como postbióticos (ISSAP, 2021; Salminen & Szajewska, 2022) junto con los componentes celulares que quedan una vez se finaliza la fermentación y se obtiene un extracto. Debido a esta naturaleza y a las fases de crecimiento propias del desarrollo microbiano, la producción de distintos metabolitos con posible capacidad antioxidante por parte de consorcios microbianos puede variar en diferentes etapas del crecimiento y presentarse en diferentes intensidades. (Real-olvera et al., 2011).

1.4. Composición microbiana general del Kéfir y posibles metabolitos contribuyentes a la capacidad postbiótica antioxidante.

La composición microbiana del kéfir es variable dependiendo de donde proviene, ubicación geográfica y condiciones de la fermentación que sean empleadas; además del sustrato donde el kéfir es fermentado (solución acuosa o leche) (Guzel-Seydim et al., 2021; Prado et al., 2015). Aun así, en general el kéfir de agua está compuesto de: Bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, y levaduras (Guzel-Seydim et al., 2021; Prado et al., 2015). Los microorganismos más representativos en la composición del kéfir de agua son: *Lactobacillus paracasei*, *Lb. hilgardii*, *Lb. nagelii* and *S. cerevisiae*. La relación simbiótica del consorcio microbiano le permite al kéfir formarse en su estructura tridimensional en forma de gránulo, donde la capa externa está conformada por *Lactobacillus* y levaduras que conforman una biopelícula de exopolisacáridos y le permiten al gránulo mantener forma (Prado et al., 2015). Esto ha mostrado otorgar protección ante los bajones de pH (Prado et al., 2015). Adentro del gránulo, una conjunción de levaduras y las bacterias sobreviven y comparten sus productos

metabólicos para producir energía y crecer. (Prado et al., 2015). Por ejemplo, las levaduras son las que aportan fuentes de nitrógeno asimilables por el consorcio (Lynch et al., 2021).

En el kéfir de agua, la matriz de exopolisacáridos está conformada por dextranos que están conformados principalmente por α -glucanos (Guzel-Seydim et al., 2021; Lynch et al., 2021), y que guardan similitudes al kefirán, los exopolisacáridos que conforman el kéfir de leche (Guzel-Seydim et al., 2021). Esta matriz de exopolisacáridos ha sido analizada en una gran cantidad de estudios y ha demostrado ser una de las principales fuentes de la capacidad antioxidante (Jaradat et al., 2013; Lynch et al., 2021; Wang et al., 2010). Otros compuestos responsables en gran cantidad de la capacidad antioxidante del kéfir son los fenoles (Bensmira & Jiang, 2015; Lettera et al., 2016; Molina-Cortés et al., 2020). De los fenoles, los ácidos fenólicos presentan una gran capacidad antioxidante y varios de estos han sido encontrados en cepas de kéfir, tales como: ácido p-cumárico, ácido ferúlico (Bensmira & Jiang, 2015) y ácido clorogénico (Du & Myracle, 2017)

1.5. Productos de kéfir y mercado potencial.

Los productos resultantes de kéfir poseen una gran variedad de presentaciones y conforman el creciente mercado de dicho producto, que en el 2020 tenía un tamaño estimado de 1.62 mil millones de dólares, con una tasa de crecimiento anual compuesto del 6.4% (Shankar Bhandalkar, 2021). Adicionalmente, al poder comprobar la capacidad postbiótica antioxidante en el consorcio objeto del estudio, se le otorga un rasgo favorable adicional para entrar en el mercado de los probióticos, cuyo tamaño alcanzó los 58.17 mil millones de dólares en el 2021 y se proyecta una tasa de crecimiento anual compuesto 7.5% anualmente (Grand view research, 2022).

2. Justificación y Objetivos:

2.1. Justificación

Debido al reconocimiento actual de otras variantes de kéfir como suplemento para la salud, este consorcio microbiano es objeto de estudio para la compañía asociada por su potencial para presentar actividades biológicas que permitan comercializarlo como un producto probiótico y/o postbiótico con varios beneficios en salud, como la estimulación de la capacidad antioxidante y regulación de ROS. Esto hace necesario un estudio que compruebe que existe una capacidad antioxidante en el extracto del kéfir a evaluar, y cuantificarla frente a un estándar comercial. Es importante dar los primeros pasos en el proceso de estandarización de producción de la porción postbiótica con capacidad antioxidante debido a que, en cuanto a crecimiento del consorcio y diversidad de especies, se han identificado los tiempos entre 72 y 96 horas de fermentación como los mejores y se hipotetiza, que es allí donde puede observarse la mayor capacidad antioxidante.

Asimismo, para la compañía contar con una porción postbiótica de este consorcio originario de Kéfir de agua, con su capacidad antioxidante determinada, significa un acercamiento a su comercialización. Dentro de la aprobación de etiquetas regulatorias, como las que se exigen

en Colombia y el mundo para formular alimentos que contengan estos productos (probióticos y/o postbióticos) se exigen unas caracterizaciones exhaustivas de las actividades bioquímicas y de las composiciones biológicas de los microorganismos y su medio de fermentación (Case, 2021).

2.2. Objetivo:

Evaluar la actividad antioxidante de la porción postbiótica de un consorcio microbiano en diferentes tiempos de fermentación.

2.3. Objetivos específicos:

- Determinar el punto máximo de actividad antioxidante de la porción postbiótica del consorcio microbiano
- Cuantificar las sustancias antioxidantes presentes en el extracto obtenido en el punto óptimo de actividad antioxidante mediante el método de análisis de la capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC)

3. Metodología

3.1. Condiciones de fermentación de cultivo y muestreo por tiempos.

Las células del consorcio microbiano que forman 'el gránulo', junto con el medio de cultivo y los métodos de fermentado fueron proporcionados por la empresa asociada. El consorcio microbiano fue cultivado a temperatura ambiente (25°C), en un medio melaza llevada a 14° Brix (20mL melaza / 100mL agua destilada). Se tomaron muestras en diferentes tiempos de fermentación y del medio melaza sin células añadidas, comenzando desde las 48h (inicio de la fase exponencial) hasta las 96h, cada 12 horas (final de la fase exponencial). Se obtuvieron siempre tres réplicas por cada tiempo de fermentación, para un total de 6 tiempos de fermentación y 18 muestras.

3.2. Filtrado y purificación

Posterior al cumplimiento de los tiempos, cada fermentado fue llevado a tubos falcón de 50mL. Estos fueron centrifugados a 2500 rpm, 4°C por 40 minutos con el objetivo de precipitar la mayoría de los sólidos. Una vez hecha la centrifugación, se hizo un posterior filtrado utilizando filtros Whatman de grado 3 (Poro de 6 µm) (Yilmaz-Ersan et al., 2018), para obtener la porción postbiótica del consorcio microbiano. Los filtrados fueron guardados en congeladores a -80°C hasta su siguiente uso.

3.3. Dilución de los extractos.

Las muestras de cada extracto de fermentado fueron diluidas en agua destilada en un volumen total de 500 uL a concentraciones de: 25, 16.6, 12.4, 6.2, 3.1 y 1.5 %V/V (Extracto/agua). Estas concentraciones provienen de un proceso previo de estandarización,

donde se buscó encontrar las concentraciones de extracto que permitieran una correcta medición de su capacidad antioxidante según el método seleccionado.

3.4. Evaluación del potencial de barrido de radicales por el método ABTS

La metodología giró en torno a la utilización del método de barrido de radicales ABTS. Cuando el ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) entra en contacto con un agente oxidante como el persulfato de sodio, se produce una reacción que deja como producto un radical catión. Este radical produce un color verdoso que es absorbido a 734nm. Una vez esta sustancia entra en contacto con una sustancia antioxidante, se produce una reducción, lo cual se puede evidenciar por métodos espectrofotométricos a 734nm (Roberta et al., 1999). La absorbancia resultante puede ser utilizada para determinar la capacidad antioxidante o actividad de barrido de radicales de la sustancia medida, para determinar sus capacidades antioxidantes, con la siguiente formula:

$$= \left(1 - \frac{(\text{Abs de muestra} - \text{Abs de blanco})}{\text{Abs de control}} \right) * 100$$

donde la **abs** = absorbancia de las muestra o el blanco (mediciones de los extractos en los diferentes tiempos y en cada una de las diluciones), la absorbancia del blanco es la medición del buffer usado en la dilución y la absorbancia del control es la medición del ABTS (Xiao et al., 2020). La medición siguió la metodología explicada por Roberta et al., 1999. El reactivo ABTS (7mM) fue preparado y mezclado con una solución de persulfato de potasio (0.18mM), se realizó vortex por 10 segundos, y esta solución fue dejada reposando por 16 horas a oscuras, con el objetivo de que terminara la reacción de oxidación entre los reactivos y se formara el ABTS+ (radical catión). Pasado este tiempo, la solución stock fue medida en un espectrofotómetro a 734 nm y llevada a una absorbancia aproximada de 0.7, diluyéndola en Buffer PBS (Buffer fosfato-salino) a un pH de 7.4. Una vez hecho esto, 990 uL de ABTS+ fueron mezclados con 10uL de cada concentración de los extractos de los diferentes tiempos, con una agitación por vortex por 10 segundos posterior a la mezcla. Se dejó reaccionar la mezcla por 5 minutos y posteriormente la absorbancia fue medida en el espectrofotómetro a 734 nm. Los resultados fueron anotados y utilizados para encontrar el potencial de barrido de radicales justo como se muestra en la ecuación previa. Este procedimiento fue realizado en todos los tiempos de fermentado y con el antioxidante Trolox.

3.5. Selección del tiempo de fermentación con mayor capacidad antioxidante

Para seleccionar el mejor tiempo de fermentación según la capacidad antioxidante, se tomaron los datos medidos y se graficaron contrastando la dilución (%v/v) del extracto de kéfir vs el porcentaje de inhibición hallado (promedio de tres medidas de cada replica para la dilución de extracto correspondiente). Una vez obtenidas dichas graficas se realizó una regresión lineal en cada una de ellas, y al obtener un coeficientes de correlación (R^2) > 0,9, se determinó cuál de las diluciones mostraba mayor capacidad antioxidante. Con las medidas de estas diluciones en cada tiempo de fermentación, se realizó un análisis estadístico comparando entre todos los tratamientos (diferentes tiempos) sus porcentajes de inhibición

del radical ABTS+. Se utilizó para este propósito de análisis estadístico un código de realización propia en el programa R (R Core Team, 2020). Posteriormente a evaluar el cumplimiento de parámetros de la ANOVA, se evidencio una falta de normalidad en los datos por lo cual se procedió con un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. Una vez se obtuvo un *p*-valor que indicaba diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de fermentación, se procedió a determinar los grupos homogéneos, realizando un Boxplot con muescas, que indica visualmente si dos grupos de datos son significativamente diferentes. Si las muescas salientes de cada diagrama de caja coinciden con el límite de otra caja, entonces los datos graficados no son significativamente diferenciales, si no lo hacen, corresponden a valores significativamente diferenciales (McGill et al., 1978).

3.6. Preparación de antioxidante Trolox.

El Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) es un antioxidante análogo a la vitamina E y es utilizado principalmente para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia (Taslimi et al., 2020)(Olszowy-Tomczyk, 2021). El método se conoce como equivalente Trolox donde el antioxidante medido es expresado en unidades conocidas como Capacidad antioxidante equivalente Trolox (TAEC) (Olszowy-Tomczyk, 2021). El método de preparación de este reactivo comparte similitudes con la preparación de las concentraciones de los extractos. La solución “stock” de Trolox fue preparada a una concentración de 10mM, para posteriormente ser preparadas a concentraciones de 16, 14, 12, 10, 8 y 6 %V/V (Trolox /Agua destilada)

3.7. Cálculo del IC₅₀ de extractos y Trolox

Una vez obtenidos los datos de los porcentajes de inhibición del radical ABTS+ para cada tiempo de fermentado, se realizó el cálculo del IC₅₀ de cada uno de los tiempos de fermentación (tratamientos) y del antioxidante Trolox. El valor IC₅₀ es un indicador que muestra cuanto de una sustancia es necesaria para inhibir el 50% de una actividad biológica o de una sustancia (Olszowy-Tomczyk, 2021). Este valor es utilizado de forma habitual en pruebas antioxidantes para determinar y comparar la capacidad inhibitoria de radicales (Olszowy-Tomczyk, 2021; Olszowy & Dawidowicz, 2018; Ratnavathi & Komala, 2016; Xiao et al., 2020). Para calcular el IC₅₀ de cada uno de los tiempos de fermentado se tomaron las regresiones lineales, teniendo en el eje Y el porcentaje de inhibición, y en el eje X la concentración de extracto de fermentado/ Trolox. De dicho análisis, se generó una gráfica para cada tiempo de fermentación y una para la sustancia Trolox. De cada gráfica de estas se obtuvo una regresión lineal utilizando las herramientas de MS Excel. Con la regresión se pudo obtener la ecuación de la gráfica siguiendo la formula $y = mx + b$, la cual, una vez reformulada en términos de x se presenta como:

$$x = \frac{y-b}{m}$$

donde *m* es la pendiente de la recta, y *b*, el intercepto.

Con esta fórmula se pudo identificar la concentración necesaria para inhibir el 50% de radicales catión ABTS+ (IC₅₀) de cada fermentación y del referente Trolox.

Finalmente, con estos datos es posible comparar cuantitativamente, la potencia de los antioxidantes producidos por el consorcio microbiano evaluado, contra un estándar de sustancia antioxidante con un poder similar al *alfa*-tocoferol o vitamina E (Trolox).

1.1. Evaluación del mejor tiempo de fermentación en términos de capacidad antioxidante equivalente Trolox

Una vez hallado el tiempo de fermentación con mayor capacidad antioxidante, se procedió a realizar el equivalente trolox. Para esto, se compararon las IC₅₀ de los mejores tiempos junto con la IC₅₀ del trolox. Una vez calculados estos datos, el equivalente trolox se calculó con la siguiente formula:

$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ de Trolox (\%V/V)}}{IC_{50} \text{ de extracto (\%V/V)}}$$

Donde un número de mayor dimensión determina una mayor capacidad antioxidante de parte del tratamiento evaluado. Una vez obtenido el TEAC en términos de porcentaje de Trolox, se pudo encontrar la concentración en mM del TEAC al conocer la concentración inicial del stock de Trolox y de las concentraciones realizadas del extracto.

2. Resultados.

2.1. Análisis cualitativo de la capacidad inhibitoria en los diferentes tiempos de fermentado de kéfir de agua.

Siguiendo las metodologías anteriormente descritas, se obtuvieron datos cuantitativos de la capacidad de la porción postbiótica de kéfir de agua para inhibir el radical ABTS+, en diferentes diluciones del extracto. Con estos datos se realizaron regresiones lineales correspondientes a cada medición de las diluciones para cada tiempo de fermentación. Se encontró que todas presentaron un R² superior al 95%. La **Figura 1** muestra una diferencia entre la capacidad antioxidante de los diferentes tiempos de fermentación, en especial de los tiempos 72, 84 y 96 horas, con el resto de fermentados. Esta diferencia se va acrecentando a medida que aumenta la concentración del extracto o porción postbiótica del consorcio microbiano de kéfir. Curiosamente, se puede ver también cómo el fermentado de 48 horas, presenta una menor capacidad antioxidante que el tiempo 0, el cual poseía solo melaza sin haber kéfir añadido.

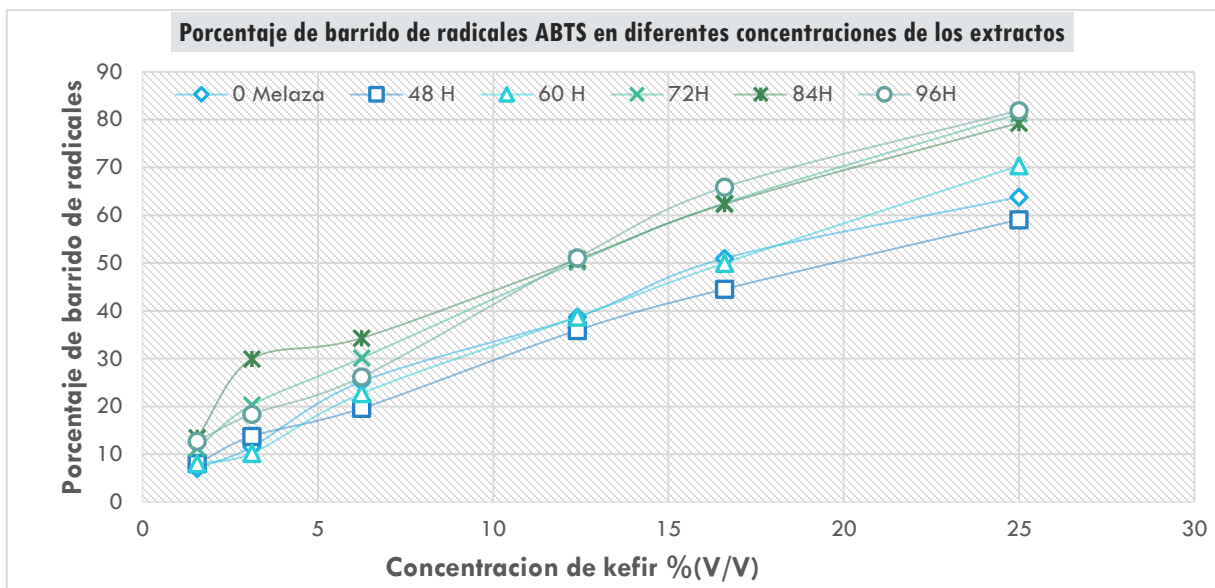


Figura 1. Capacidad de inhibición de radicales ABTS+ vs concentración de extracto o porción postbiótica del consorcio microbiano de kéfir, para cada uno de los tiempos de fermentación analizados.

Observando dicha gráfica, se concluye que hubo una mayor diferencia entre las mediciones a medida que hubo mayor concentración de kéfir, y por lo tanto las pruebas estadísticas posteriores se realizaron utilizando los datos de porcentaje de inhibición de radicales encontrados en las diluciones de 25% v/v de cada tiempo de fermentación.

2.2. Mayor capacidad antioxidante en la dilución 25% v/v según el tiempo de fermentación del kéfir de agua.

Una vez seleccionadas del análisis anterior, las diluciones de 25% v/v como las que demuestran con mayor fidelidad la cantidad de sustancias antioxidantes presentes en los extractos de kéfir de agua o porción postbiótica, se realizó un análisis estadístico de los valores (**Figura 2**). Se pudo comprobar que existía una diferencia entre los grupos (p -value ≤ 0.05), y que especialmente existían tres subpoblaciones: el grupo A (correspondiente a los extractos de 0 y 48 horas), el grupo B (correspondiente al extracto de 60 horas), y el grupo C (correspondiente a los extractos de 72, 84 y 96 horas) tal como se muestra en la **Figura 3**, correspondiente al diagrama de cajas y bigotes con muescas. Esto nos demuestra que existe una mayor capacidad inhibitoria de radicales en los tiempos de fermentación desde 72 hasta las 96 horas, además de que hay un aumento de la capacidad antioxidante a lo largo de la fase exponencial.

Kruskal-Wallis rank sum test

data: INHIB by TIEMPO

Kruskal-Wallis chi-squared = 14.972, df = 5, p-value = 0.01048

Figura 2. Prueba Kruskal-Wallis. El p-value nos muestra una confianza por encima del 95%

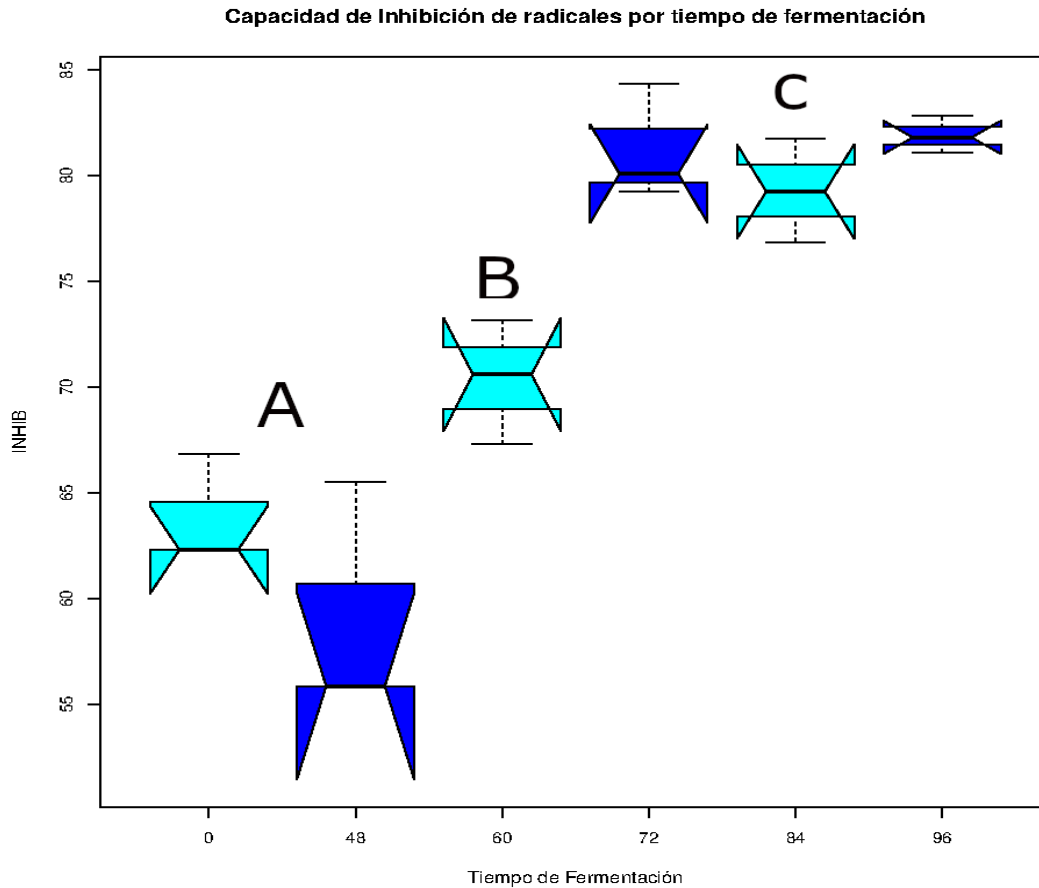


Figura 3. Gráfico de cajas y bigotes con muescas, del porcentaje de Inhibición del radical ABTS+ vs tiempo de fermentación, para hallar los grupos estadísticamente homogéneos. El grupo A es conformado por los tiempos 0 (Melaza) y 48 horas. El grupo B es conformado por el fermentado de 60 h y el grupo C representa a los tiempos que presentaron mayor capacidad de inhibición de radicales, conformado por 72,84 y 96 horas.

2.3. Análisis de capacidad antioxidante medida en equivalente Trolox

Una vez hallados los grupos de tratamientos que presentaban una diferencia estadísticamente significativa en su capacidad antioxidante, se obtuvo su capacidad antioxidante en términos del valor estándar de Trolox, a partir de las mediciones del IC₅₀, como se especifica en la metodología anteriormente descrita. Como se observa en el gráfico

de barras de la **Figura 4**, El valor de equivalente trolox para el grupo C llega a ser aproximadamente un 1.5 veces mayor que el valor equivalente trolox para la melaza y siendo que estos datos son derivados de las anteriores mediciones, se sabe que son significativamente diferentes las mediciones del grupo C a las de la melaza (Grupo A).

Este método permitió ver además la capacidad antioxidante del fermentado en términos cuantitativos expresados en concentraciones mM de la capacidad equivalente trolox. Gracias a esto, se obtienen datos que pueden ser usados en estudios futuros, que comparen las capacidades antioxidantes de los fermentados medidos con otros antioxidantes comerciales, o estudios que analicen el mismo fermentado bajo diferentes condiciones.

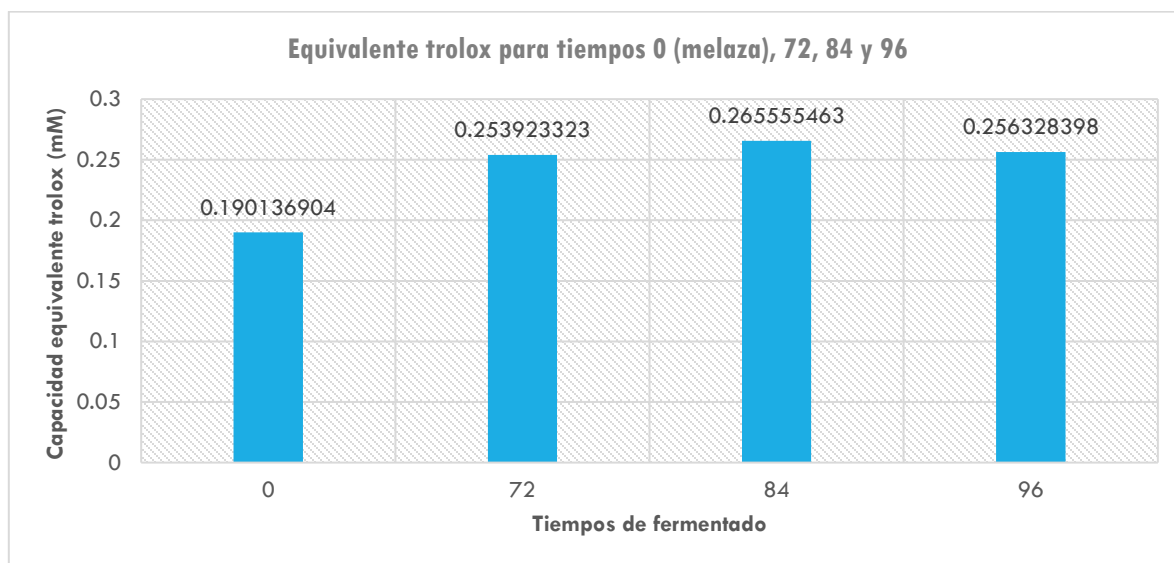


Figura 4 Grafica de barras de los valores de equivalente trolox para el grupo homogéneo C (correspondiente a los tiempos de fermentación de 72, 84 y 96h) en comparación al valor al equivalente trolox de la melaza (sustrato inicial).

3. Discusión

El kéfir de agua y las comunidades que crecen en este alimento fermentado, se han caracterizado por producir una gran cantidad de sustancias bioactivas, entre las que se encuentran los exopolisacáridos, el ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, aminoácidos, y microelementos (Aiello et al., 2020; Prado et al., 2015). Dichas sustancias le confieren actividades antihipertensivas, antioxidante, antialérgicas, antitumorales, antibióticas, antiinflamatorias y reductoras de colesterol (Aiello et al., 2020; Prado et al., 2015).

En el proyecto de investigación dentro del cual se realizó el presente trabajo, se hicieron trabajos conjuntos, donde se analizaron las comunidades de microorganismos que contenía el consorcio microbiano proveniente de kéfir de agua, propiedad de la empresa aliada, hallando un enriquecimiento de diversos grupos microbianos entre las 72-84 horas de

fermentación, tanto por métodos cultivables (Fig. 5), como por métodos metagenómicos (Fig. 6 y 7)

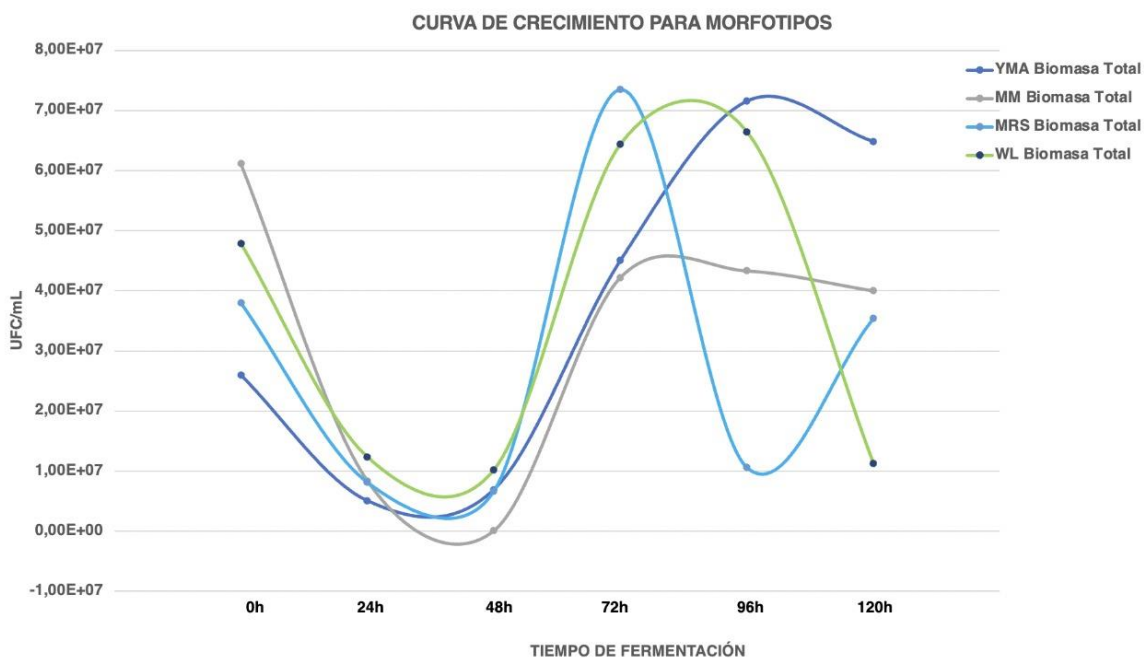


Figura 5. Dinámicas poblacionales de células cultivables de diferentes grupos microbianos (levaduras, bacterias del ácido láctico y bacterias del ácido acético) de kéfir de agua propiedad de la empresa aliada, aisladas selectivamente en diferentes medios de cultivo. La grafica esta expresada en Unidades formadoras de colonias por mL de fermentación (UFC/mL) vs tiempo de fermentación (horas)

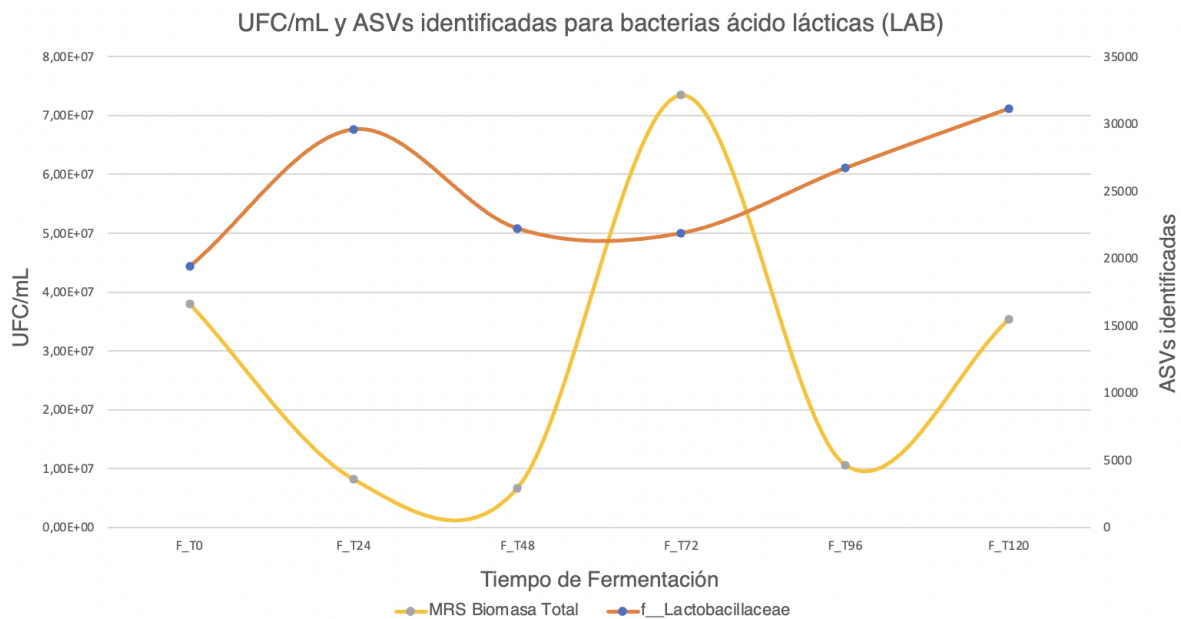


Figura 6. Metagenómica de familias de bacterias ácido lácticas en consorcio microbiano extraído del kéfir medido en UFC/mL y ASVs en tiempos de fermentación. ASV corresponde a las taxa identificadas por familia de bacterias presentes en el tiempo de fermentación.

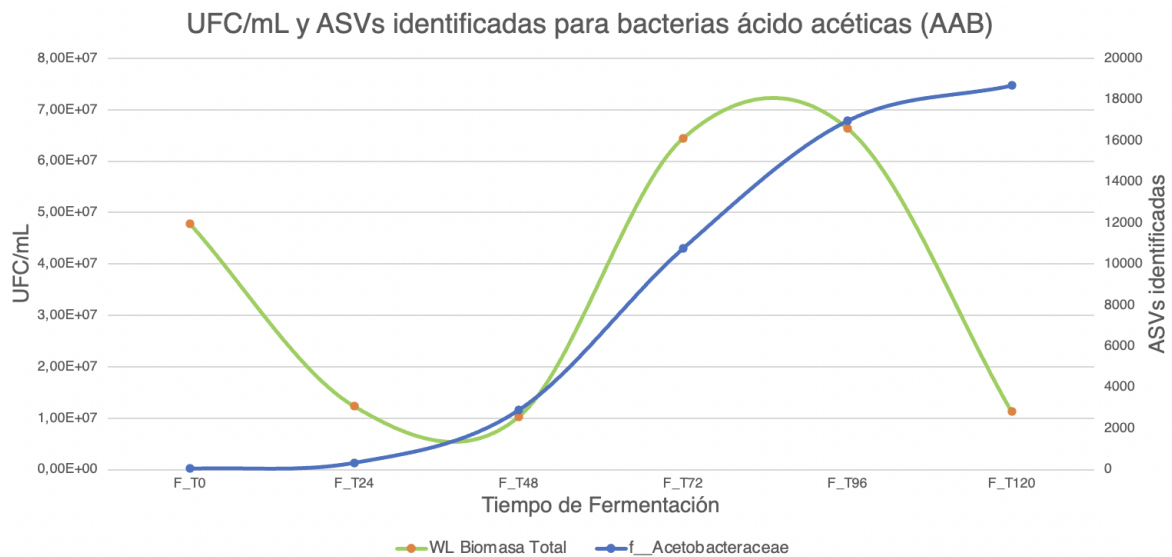


Figura 7. Metagenómica de familias de bacterias ácido acéticas en consorcio microbiano extraído del kéfir medido en UFC/mL y ASVs en tiempos de fermentación. ASV corresponde a las taxa identificadas por familia de bacterias presentes en el tiempo de fermentación.

Quando se obtuvieron dichos resultados, se hipotetizó que, al aumentar la diversidad de especies y de grupos microbianos durante este intervalo de tiempo de la fermentación, la probabilidad de que los diferentes metabolismos microbianos generaran una mayor riqueza química y, por ende, mayor actividad biológica. Entre estas bioactividades se encontraba por

supuesto la actividad antioxidante. En este estudio se encontró, tal como muestra la **Figura 5**, que la fase de máximo crecimiento, donde había una mayor cantidad de unidades formadoras de colonias, sucedía a partir de las 68 horas aproximadamente hasta las 96 horas, teniendo los puntos máximos para los grupos microbianos de bacterias del ácido láctico, las bacterias del ácido acético y las levaduras a las 69, 80 y las 96 horas respectivamente, por ende, se hipotetizó que la mayor capacidad antioxidante sucedería entre esos tiempos. En línea con lo supuesto, la mayor capacidad antioxidante se mantuvo de 72 horas en adelante, mostrando que, si había un crecimiento de capacidad antioxidante en similitud al alcance de la mayor población microbiana y a la sucesión de poblaciones con mayor diversidad. Lo que fue un hallazgo no esperado, fue ver que la capacidad antioxidante se mantuvo después de que la población empezara a disminuir. Esto lleva a la hipótesis de que, una vez la población empieza a disminuir la capacidad antioxidante no se pierde. Debido tal vez, a que muchos compuestos intracelulares se liberan al medio de cultivo como los polisacáridos y fenoles de acuerdo con los estudios citados anteriormente, aumentando el *pool* de sustancias como vitaminas, equivalentes reductores y ácidos orgánicos que sostienen la capacidad antioxidante a pesar del decaimiento de la población microbiana. Para comprobar esta hipótesis se proponen experimentos futuros, donde se mida la capacidad antioxidante de extractos fermentados de kéfir de agua hasta más allá de las 96 horas.

En cuanto a los valores hallados y reportados en la **Figura 4**, que miden la capacidad antioxidante de la porción postbiótica del kéfir de agua en términos Trolox podemos realizar diferentes comparaciones. Los valores de los tiempos de fermentación equivalentes al grupo C (72, 84 y 96 horas) en comparación al valor equivalente Trolox de la melaza, presentan aproximadamente 1.5 veces mayor capacidad antioxidante. Esto es un dato importante para tener en cuenta pero debe ser tomado con precaución ya que la melaza es también reconocida por tener capacidades antioxidantes (Guimarães et al., 2007; Molina-Cortés et al., 2020). Esto puede indicar que la actividad antioxidante de la melaza este aportándole a la del kéfir, pero en una proporción incierta, pues se observa un aumento significativo con respecto a la medición de melaza sola. Esto puede deberse a que los microorganismos usan diferentes vías metabólicas para: i) Utilizar los antioxidantes del medio melaza y producir nuevas sustancias; ii) transforman las existentes en unas de mayor capacidad o iii) Producir sustancias completamente nuevas en capacidad antioxidante que se suman a las de la melaza. Por estas razones, sería importante utilizar medios con menores capacidades antioxidantes para tener una mejor imagen de la capacidad antioxidante del kéfir únicamente, sin tener un 'fondo antioxidante'. Aun así, los datos demuestran que, si existe una capacidad antioxidante significativa y junto con los valores de equivalente de trolox calculado, nuevas mediciones de diferentes antioxidantes, otras cepas de kéfir y del kéfir cultivado en otros medios pueden hacerse para comparar con los resultados obtenidos.

Finalmente, varios estudios muestran que la capacidad antioxidante de diferentes alimentos y del kéfir mismo se deben a los exopolisacáridos (Rahbar Saadat et al., 2020; Wang et al., 2010; Xu, Shang, et al., 2011; Xu, Shen, et al., 2011) y a fenoles (Bensmira & Jiang, 2015; Lettera et al., 2016; Molina-Cortés et al., 2020) producidos por los microorganismos que los conforman. Por ende, estudios que se centren en la extracción y subsecuente análisis de la

capacidad antioxidante de estos tipos de compuestos daría una visión mucho más específica de los metabolitos responsables de la actividad antioxidante presente en esta línea de kéfir.

4. Conclusiones y recomendaciones

Bajo los métodos de análisis utilizados en este proyecto se puede afirmar que la mayor capacidad antioxidante de la porción postbiótica de kéfir se obtiene desde las 72 horas de fermentación hasta las 96 horas.

Las porciones postbióticas, producto de la fermentación de kéfir de agua propiedad de la empresa aliada, tienen una capacidad antioxidante en términos cuantitativos 1.5 veces mayor al medio de cultivo en el que se fermentan.

La capacidad antioxidante aumentada en aproximadamente 50% respecto al medio de cultivo denota una funcionalidad postbiótica en el extracto de kéfir que puede dar los pasos iniciales para enunciarse comercialmente como un beneficio para el consumidor.

5. Referencias

- Afshar, P., Shokrzadeh, M., Raeisi, S. N., Ghorbani-HasanSaraei, A., & Nasiraii, L. R. (2020). Aflatoxins biodetoxification strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon*, 178(November 2019), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.02.007>
- 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>
- Bensmira, M., & Jiang, B. (2015). Total phenolic compounds and antioxidant activity of a novel peanut based kefir. *Food Science and Biotechnology*, 24(3), 1055–1060. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0135-7>
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
- Case, I. (2021). *The Regulation of Probiotics*. 103, 1017–1027.
- Darbandi, A., Mirshekar, M., Shariati, A., Moghadam, M. T., Lohrasbi, V., Asadolahi, P., & Talebi, M. (2019). The effects of probiotics on reducing the colorectal cancer surgery complications: A periodic review during 2007–2017. *Clinical Nutrition*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.11.008>
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India*, 52(OCT), 794–804.
- Diniz, R. O., Garla, L. K., Schneedorf, J. M., & Carvalho, J. C. T. (2003). Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacological Research*, 47(1), 49–52. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(02\)00240-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00240-2)
- Du, X., & Myracle, A. D. (2017). Antioxidant Capacity and Stability of Phenolic Compounds in Aronia Kefir during in vitro Digestion. *The FASEB Journal*, 31(S1), 972.8-972.8. https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.972.8
- Grand view research. (2022). *Probiotics Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Probiotic Food & Beverages, Probiotic Dietary Supplements), By Ingredient (Bacteria, Yeast), By End Use, By Distribution Channel, And Segment Forecasts, 2021 - 2030*. Grand View Research.
- Guimarães, C. M., Gião, M. S., Martinez, S. S., Pintado, A. I., Pintado, M. E., Bento, L. S., & Malcata, F. X. (2007). Antioxidant Activity of Sugar Molasses, Including Protective Effect Against DNA Oxidative Damage. *Journal of Food Science*, 72(1), C039–C043. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00231.x>
- Guzel-Seydim, Z. B., Gökırmaklı, Ç., & Greene, A. K. (2021). A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 113(March), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>
- Guzel-Seydim, Z. B., Kok-Tas, T., Greene, A. K., & Seydim, A. C. (2011). Review: Functional

- Properties of Kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 261–268. <https://doi.org/10.1080/10408390903579029>
- He, X., Zou, Y., Yoon, W. B., Park, S. J., Park, D. S., & Ahn, J. (2011). Effects of probiotic fermentation on the enhancement of biological and pharmacological activities of *Codonopsis lanceolata* extracted by high pressure treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(2), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.04.003>
- Held, P., & BioTek Instruments, I. (2015). An introduction to reactive oxygen species measurement of ROS in yeast cells. *TechNote*, 1–21. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- ISSAP. (2021). *Behind the publication: Understanding ISAPP's new scientific consensus definition of postbiotics*. ISAPP Science Blog. <https://isappscience.org/behind-the-publication-understanding-isapps-new-scientific-consensus-definition-of-postbiotics/>
- Jäger, R., Purpura, M., Farmer, S., Cash, H. A., & Keller, D. (2018). Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 improves protein absorption and utilization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(4), 611–615. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9354-y>
- Jaradat, Z., Aboudi, A. Al, Shatnawi, M., & Ababneh, Q. (2013). *ANTIOXIDANT POTENCY OF WATER KEFIR*. 2(6), 2455–2461.
- Kushugulova, A., Saduakhasova, S., Kozhakhmetov, S., Shakhbayeva, G., Tynybayeva, I., Nurgozhin, T., Marotta, F., & Zhumadilov, Z. (2014). Antioxidant activity of the probiotic consortium in vitro. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 9(1–2), 55–60. <https://doi.org/10.5195/cajgh.2013.115>
- Lettera, V., Pezzella, C., Cicatiello, P., Piscitelli, A., Giacobelli, V. G., Galano, E., Amoresano, A., & Sannia, G. (2016). Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 196, 1272–1278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.074>
- Luang-In, V., & Deeseenthum, S. (2016). Exopolysaccharide-producing isolates from Thai milk kefir and their antioxidant activities. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.068>
- Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2021). An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *International Journal of Food Microbiology*, 345(February), 109128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>
- McGill, R., Tukey, J. W., & Larsen, W. A. (1978). Variations of Box Plots. *The American Statistician*, 32(1), 12–16. <https://doi.org/10.2307/2683468>
- Molina-Cortés, A., Sánchez-Motta, T., Tobar-Tosse, F., & Quimbaya, M. (2020). Spectrophotometric Estimation of Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Molasses and Vinasses Generated from the Sugarcane Industry. *Waste and Biomass Valorization*, 11(7), 3453–3463. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00690-1>
- Olszowy-Tomczyk, M. (2021). How to express the antioxidant properties of substances

- properly? *Chemical Papers*, 75(12), 6157–6167. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01799-1>
- Olszowy, M., & Dawidowicz, A. L. (2018). Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? *Chemical Papers*, 72(2), 393–400. <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0288-3>
- Plessas, S., Nouska, C., Mantzourani, I., Kourkoutas, Y., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2017). Microbiological exploration of different types of Kefir grains. *Fermentation*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010001>
- 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. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1177. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. <https://www.r-project.org/>
- Rahbar Saadat, Y., Yari Khosroushahi, A., Movassaghpour, A. A., Talebi, M., & Pourghassem Gargari, B. (2020). Modulatory role of exopolysaccharides of *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii* as probiotic yeasts from dairy products in human colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 64(September 2019), 103675. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103675>
- Ratnavathi, C. V., & Komala, V. V. (2016). *Chapter 1 - Sorghum Grain Quality* (C. V Ratnavathi, J. V Patil, & U. D. B. T.-S. B. Chavan (eds.); pp. 1–61). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803157-5.00001-0>
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Real-olvera, J., Prieto-garcía, F., & Alberto, J. (2011). FACTIBILIDAD DEL EMPLEO DE UN CONSORCIO MICROBIANO EN EL TRATAMIENTO DE VINAZAS. *Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo En México.*, 339–351.
- Roberta, R., Nicoletta, P., Anna, P., Ananth, P., Min, Y., & Catherine, R.-E. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(98), 1231–1237. https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/50321545/Re_R._et_al._Antioxidant_activity_applyi20161115-18929-iek29e.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1508998733&Signature=2lCy4YP1daVEDPJvzowzUwyQZwQ%253D&response-content-disposition=inlin
- Salminen, S., & Szajewska, H. (2022). Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. *Textbook of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*, 733–736. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80068-0_55
- Shankar Bhandalkar. (2021). *Kefir Market by Nature (Organic and Conventional), Product type (Flavored and Unflavored) , Application (Foods & Beverages and Pharmaceutical) and Source (Animal milk, Soy milk, Coconut milk and Others): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast 20*. Allied Market Research. <https://www.alliedmarketresearch.com/press-release/kefir-market.html>
- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X., & Lima, Á. S. (2009). Antimicrobial Activity of Broth

- Fermented with Kefir Grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(2), 316–325. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8303-3>
- Taslimi, P., Köksal, E., Gören, A. C., Bursal, E., Aras, A., Kılıç, Ö., Alwasel, S., & Gülçin, İ. (2020). Anti-Alzheimer, antidiabetic and antioxidant potential of *Satureja cuneifolia* and analysis of its phenolic contents by LC-MS/MS. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(3), 4528–4537. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.10.002>
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., & Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.013>
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1(1), 60–69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>
- Xu, R., Shang, N., & Li, P. (2011). In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH. *Anaerobe*, 17(5), 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.07.010>
- Xu, R., Shen, Q., Ding, X., Gao, W., & Li, P. (2011). Chemical characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fraction isolated from *Bifidobacterium animalis* RH. *European Food Research and Technology*, 232(2), 231–240. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1382-8>
- Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A., & Sahin, S. (2018). Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefir. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3788–3798. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13871>

