

Kéfir de agua: Características, producción y fabricación de biopelículas como una alternativa de uso de excedentes. Revisión.

Water kefir: Characteristics, production, and manufacturing of biofilms as an alternative use of surplus. Review

Vargas Sara A.^{ab}. y Ruiz-Espinosa H.^{b*}.

^a Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología. Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor, Demarcación Territorial Benito Juárez, C.P. 03940, Ciudad de México

^b Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, Facultad de Ingeniería Química, Colegio de Ingeniería en Alimentos, 18 Sur y Avenida San Claudio, 72570 Puebla, México

* E-mail: hector.ruiz@correo.buap.mx

Resumen

El desarrollo de nuevos materiales de base biológica que ayuden a disminuir los desechos plásticos se ha convertido en una prioridad industrial para la sostenibilidad. El uso de biomasa microbiana representa una alternativa viable al ser una fuente de polímeros completamente renovable. La presente revisión se centra en el uso de biomasa microbiana obtenida a partir del kéfir de agua para formar películas biodegradables con aplicaciones alimentarias. Al obtenerse un exceso de biomasa en cada fermentación, darle un valor agregado a este excedente permitiría obtener dextrano a un costo asequible, sin requerir procesos de extracción complejos, mientras que paralelamente se genera un producto nutritivo con propiedades funcionales benéficas para la salud, representando una alternativa atractiva a los materiales poliméricos convencionales.

Palabras claves: *Biopelículas, dextrano, fermentación, kéfir de agua, microbiota.*

Abstract

The development of new bio-based materials that help reduce plastic waste has become an industrial priority sustainability-wise. The use of microbial biomass represents a viable alternative as it is a completely renewable source of polymers. The present review focuses on the use of microbial biomass obtained from water kefir to form biodegradable films with food applications. As an excess of biomass is obtained in each water kefir fermentation, giving added value to this surplus would allow dextran to be obtained at an affordable cost, without requiring complex extraction processes, while in parallel a nutritious product with functional properties beneficial to health is generated, representing a attractive alternative to conventional polymeric materials.

Key Words: *Biofilm, dextran, fermentation, sustainable packing, water kefir.*

Introducción

El kéfir de agua es una bebida fermentada artesanal, ligeramente espumosa, afrutada y carbonatada, con alto contenido en ácido láctico (hasta 2%) y bajo contenido alcohólico (normalmente inferior al 1%), tradicionalmente producida por fermentación de una solución de sacarosa a la que se le añaden frutas frescas o secas y los denominados granos de kéfir de agua (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Moretti et al., 2022).

Los granos de kéfir tanto de leche como de agua son partículas gelatinosas que contienen microorganismos probióticos. Si bien, los dos tipos de bebidas fermentadas se obtienen a partir de estos granos, éstas tienen características físicas y químicas diferentes y una composición microbiológica distinta; mientras que el kéfir de leche se ha estudiado ampliamente, solo algunos estudios abordan al kéfir de agua (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021), cuyo consumo se ha incrementado recientemente y exhibe una tendencia a la alza, potenciado por la tendencia global hacia el consumo de productos percibidos como saludables, entre ellos, los fermentados. Entre los países con mayor consumo de kéfir de agua se encuentran Estados Unidos, México y Canadá, en Norteamérica; Francia, Grecia, Turquía, Rumanía, Rusia, Reino Unido, Bélgica, Países Bajos, Noruega, Suecia, España y Portugal en Europa; y Brasil, Chile, Perú y Argentina en América (Moretti et al., 2022).

Además de las tendencias de mercado orientadas a productos percibidos como saludables durante la pandemia de COVID 19 se exploraron agentes antivirales no convencionales para reducir el riesgo de infección y promover una recuperación rápida de esta enfermedad. Debido al potencial de actividad antiviral, los alimentos fermentados y sus bacterias probióticas recibieron especial interés. Varias cepas de probióticos demostraron una amplia gama de actividades antivirales y diferentes mecanismos de acción, debido a la estimulación de la función del sistema inmunitario y a la producción de componentes bioactivos (Moretti et al., 2022; Muhialdin et al., 2021). Al kéfir de agua se le han atribuido propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y hepatoprotectoras y se considera puede ayudar a mejorar la salud intestinal y la

respuesta inmune (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021).

El desarrollo de polímeros de base biológica está ganando cada vez más importancia en materia de investigación y desarrollo industrial, potenciado por preocupaciones medioambientales (incremento de desechos plásticos, calentamiento global, reducción en la disponibilidad de recursos fósiles). La industria del empaquetado se encuentra en búsqueda de nuevos materiales asequibles y más durables que los tradicionales (Cottet et al., 2020; Linares-Bravo et al., 2022). En particular, existe un interés creciente en el desarrollo de membranas renovables y biodegradables obtenidas a partir de proteínas, polisacáridos y lípidos, que pueda emplearse como recubrimiento de alimentos y actuar como barrera para controlar la transferencia de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, lípidos y otros ingredientes con el objetivo de preservar el sabor, mantener la calidad e incrementar la vida de anaquel de los productos; además pueden ser usadas como acarreadores (carriers) para ingredientes funcionales, como antimicrobianos, o antioxidantes y, para mejorar la apariencia y manipulación de los productos (Linares-Bravo et al., 2022).

En el campo industrial, la mayoría de películas de base biológica son aquellas que proceden de plantas (almidón, pectina), algas (alginato, carragenina), proteínas animales (gelatina, caseína) y algunos polisacáridos microbianos (xantana) (Linares-Bravo et al., 2022; Moretti et al., 2022). La búsqueda de alternativas poliméricas y/o diferentes estrategias de formulación de películas ha ido ganando cada vez más protagonismo. De hecho, se han reportado mejoras considerables en las propiedades de nanocompuestos, mezclas y la obtención de películas activas, principalmente involucrando bases de polisacáridos. Dentro de esta clase de biopolímeros, los exopolisacáridos (EPSs), como el dextrano presente en el kéfir de agua, han recibido especial atención. Éstos son producidos por una variedad de bacterias, las cuales los secretan en forma de cápsulas o como una delgada capa alrededor de la célula bacteriana (Marangoni Júnior, Vieira & Anjos, 2020). Particularmente, en la producción de kéfir de agua, a medida que se producen los ciclos de fermentación, la cantidad de biomasa aumenta y la que no se utiliza como inóculo para la siguiente fermentación, es

decir, la biomasa sobrante, suele desecharse. Este excedente de volumen de granos de kéfir puede emplearse como fuente de extracción de dextrano (Linares-Bravo et al., 2022; Moretti et al., 2022). De ahí que una alternativa para la valorización de esta biomasa residual sea su incorporación en matrices a base de biopolímeros para el desarrollo sostenible de películas (Marinho et al., 2023).

Si bien, el uso del kefirano (EPS del kéfir de leche) ha sido bastante documentado, poco se sabe sobre la bioactividad de los EPSs del kéfir de agua. Debido a sus atractivas propiedades tecnológicas recientemente se ha buscado el uso alternativo de estos polisacáridos para la formación de películas (Coma et al., 2019; Cottet et al., 2020; Linares-Bravo et al., 2022). Con base en lo anterior, la presente revisión se centra en el uso de biomasa microbiana de kéfir de agua como fuente de biopolímeros para formar nuevos materiales y utilizarlos en la formulación de películas de base biológica para su uso en industria alimentaria.

Dextrano

Los polímeros de base biológica son aquellos que se sintetizan a partir de recursos renovables en lugar de utilizar recursos fósiles como el petróleo y el gas natural, preferiblemente a través de procesos biológicos y bioquímicos. Se caracterizan por ser carbono- neutrales, por lo que la concentración de CO₂ atmosférico no cambia aún después de la incineración. Dentro de los polímeros de base biológica se encuentran los biopolímeros, que son polímeros naturales formados por plantas (como celulosa, almidón), animales (como quitina, gelatina) y microorganismos (como kefirano, β-glucano, dextrano) (Cottet et al., 2020).

El dextrano es sintetizado en particular por las LAB cuando son expuestas a un medio con sacarosa como fuente de carbono. En algunas LAB como *Lactobacillus* sp., la sacarosa puede entrar directamente en la célula vía el sistema de fosfotransferasa (SFT) y metabolizarla para formar D-lactato o convertirse en dextrano. Las bacterias dextran-sacarosas, localizadas extracelularmente son las responsables de hidrolizar la sacarosa en sus monómeros fructosa y glucosa, formando un intermedio con glucosa (glicosil-enzima) para más tarde llevar a cabo la polimerización y formar

dextrano, mientras que la fructosa resultante ingresa a la bacteria a través de SFT para satisfacer su demanda metabólica. El dextrano también puede ser sintetizado vía enzimática, usando directamente dextranosacarosas (1,6-alfa-D-glucano-6-alfa-glucosiltransferasa), la cual polimeriza la glucosa de la sacarosa en dextrano (Díaz-Montes, 2021).

La matriz de los granos de kéfir de agua está formada principalmente por dextrano (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021). El dextrano es un EPS sintetizado en el kéfir de agua por *L. hilargdii* a partir de sacarosa y es completamente insoluble. Químicamente, es un homopolisacárido, α-1,6 dextrano ramificado, con un peso molecular que varía entre 450-2000 kDa, con un grado de polimerización estimado entre 3460 y 3630 monosacáridos. Su cadena molecular principal está formada por unidades de glucosa unidas por enlaces α-1,6 con algunas ramificaciones formadas por enlaces glucosídicos α-1,3 (Moretti et al., 2022; Pendón et al., 2022).

En general, los dextranos son reconocidos como moléculas bioactivas con alto potencial para ser considerados prebióticos y resultan una alternativa prometedora para ser utilizados como aditivos alimentarios funcionales (Moretti et al., 2022). Recientemente se ha buscado el uso alternativo de este polisacárido para la formación de películas (Coma et al., 2019; Cottet et al., 2020; Linares-Bravo et al., 2022) y como hidrocoloide para emplearse en productos horneados (Moretti et al., 2022).

Kéfir de agua

El kéfir de agua es una bebida fermentada artesanal, normalmente producida por la fermentación de una solución de sacarosa a la que se le han añadido frutas frescas o secas. Tiene un sabor afrutado y ligeramente ácido y se percibe como carbonatado en boca (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Moretti et al., 2022). Su composición y características sensoriales dependen de las variables de fermentación (Pendón et al., 2022).

El kéfir de agua contiene microorganismos viables, residuos de medio de fermentación (azúcar o frutas) y varios metabolitos como resultado de la fermentación de la sacarosa, glucosa y fructosa, principalmente ácidos orgánicos (láctico, acético), etanol, CO₂, manitol, vitaminas (del complejo B) y

aminoácidos como la arginina. Además, en esta bebida también se pueden encontrar diferentes polisacáridos producidos por los microorganismos principalmente, glucanos (polímeros de glucosa) y en menor medida levanos (polímeros de fructosa). Se han identificado alrededor de treinta compuestos aromáticos que influyen en el sabor del kéfir de agua incluyendo metil ésteres, que se derivan de algunas frutas usadas en el proceso (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Pendón et al., 2022). La fermentación se lleva a cabo por *granos* de kéfir de agua que también se conocen como *tibicos* o *tibi*; son estructuras gelatinosas de 5 a 20 mm de diámetro, con forma irregular similar a una coliflor, y constituyen la matriz de polisacáridos (dextrano, levano) en la que los microorganismos coexisten de forma simbiótica. Su contenido aproximado de materia es del 10-14% (p/p) (Lynch et al., 2021; Pendón et al., 2022); tienen apariencia gelatinosa y translúcida y su color varía de amarillo a marrón, pues puede estar influenciado por el material fermentado (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Moretti et al., 2022).

Beneficios a la salud del consumo de kéfir de agua

Los microorganismos que se encuentran en el kéfir de agua no son patógenos y, junto con los ácidos orgánicos que producen (y que se encuentran en el producto fermentado) son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Salmonella typhimurium*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, así como de hongos filamentosos como *Aspergillus flavus* (Moretti et al., 2022). En adición a esta actividad antimicrobiana, al kéfir de agua se le han asignado características inmunomodulantes, antihipertensivas, antitumorales, anticancerígenas, hepatoprotectivas, antitoxigénicas, hipocolesteromias, hiperglicémicas, antihiperlipídicas, antioxidantes, antiedematosas, antiinflamatorias y antiulcerogénicas. Asimismo, puede ayudar a mejorar la salud intestinal y la inmunidad (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022). Estos efectos podrían atribuirse tanto a los microorganismos benéficos que se encuentran en la bebida fermentada como a sus metabolitos (ácidos orgánicos y oligosacáridos), de forma directa,

o indirecta, a través de la estimulación de la microbiota intestinal. Sin embargo, aún se necesitan más investigaciones para comprender los múltiples beneficios a la salud asociados al consumo de kéfir de agua (Moretti et al., 2022), ya que las diferencias en el método de producción y factores tales como el origen del inóculo, los sustratos utilizados, la temperatura de fermentación y el tiempo influyen en el tipo y concentración de agentes bioactivos generados (Lynch et al., 2021). Es importante mencionar que a menudo se consume el kéfir como una bebida artesanal o de fabricación casera, por lo que no ni el proceso de fermentación ni la identidad de las cepas probióticas empleadas en su fabricación están regulados; por tanto, es necesario incorporarla a la legislación alimentaria de los países donde se consume (Moretti et al., 2022). Hasta 2021 ninguna cepa bacteriana había recibido aprobación para ser considerada como probiótico en la Unión Europea (Lynch et al., 2021).

Proceso de fermentación

La composición del kéfir de agua y sus características sensoriales dependen de diferentes factores del proceso de fermentación como el inóculo (origen de los granos), la concentración y tipo de azúcar, composición del medio, capacidad buffer, concentración de calcio, incorporación de oxígeno, tiempo y temperatura de fermentación, el tipo de fruta añadida, entre otros (Lynch et al., 2021; Pendón et al., 2022). Durante la fermentación, hay procesos que suceden simultáneamente como el crecimiento de los granos de kéfir y la síntesis de glucano. Durante las primeras 24 h de fermentación, la concentración de sacarosa disminuye en un 98%, mientras que la concentración de etanol se incrementa, y sucesivamente, la de ácido láctico, glicerol, acetato y manitol; este consumo inicial de sacarosa está positivamente correlacionado con la producción de etanol por las levaduras (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*). Las levaduras también poseen una invertasa que hidroliza la sacarosa, incrementando la concentración de fructosa y glucosa, que son metabolizadas por las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas. En etapas avanzadas del proceso, los niveles de etanol disminuyen debido a su conversión en acetato por las bacterias ácido acéticas (Pendón et al., 2022).

Artículos

El kéfir de agua tradicionalmente se produce de forma casera, es por eso que hasta la fecha no se ha desarrollado un proceso a escala industrial ni cultivos iniciadores de cepa definidos (Lynch et al., 2021). Si bien, la fermentación del kéfir de leche se ha estudiado ampliamente, se puede encontrar menos información científica concerniente a la

producción a escala comercial del kéfir de agua, las características de los granos y parámetros de fermentación óptimos (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021). En el Tabla 1 se enlistan algunas condiciones generales de fermentación reportadas en la bibliografía.

Tabla 1. Condiciones de fermentación del kéfir de agua

Biomasa (% p/v)	Sustrato (% p/v)	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo (h)	Referencia
6-20	Azúcar (6-30)	21	24-48	(Pendón et al., 2022).
6 a 30	Sacarosa (6,10)	20-25	24-72	(Moretti et al., 2022)
10	Azúcar refinada, azúcar morena, azúcar de coco, azúcar demerara, melaza de caña (10)	27	48	(Tavares et al., 2023)
20	Azúcar (4)	21	17,21,25,29	(Laureys et al., 2022)

Fuente: Elaboración propia.

Las condiciones de fermentación también afectan los metabolitos que se producen, y esto está estrechamente relacionado con el efecto biológico de la bebida, ya que los componentes bioactivos proporcionarán diferentes beneficios potenciales para la salud en función de su naturaleza y modo de acción, que en muchos casos aún se deben dilucidar. Cualquier variación en el proceso de fermentación puede originar cambios en la microbiota y en la calidad del producto, por lo que las principales variables de proceso son revisadas a continuación (Safak et al., 2023; Zannini et al., 2023).

Microorganismos presentes en el kéfir de agua

Los granos de kéfir de agua constituyen un sistema microbiológico complejo de bacterias y levaduras que coexisten de forma simbiótica y que permanecen inmersas e inmovilizadas en una matriz de EPSs (principalmente dextrano y levano) (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022). Existen variaciones en la microbiota de los granos que dependen de su origen geográfico, de las condiciones de fermentación y de los sustratos utilizados (Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022). De manera general, los grupos microbianos

presentes en el grano de kéfir de agua son bacterias ácido lácticas (LAB) ($10^7 - 10^8$ UFC/g de grano; principalmente *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp. y *Streptococcus* sp.), ácido acéticas (BAA) ($10^6 - 10^7$ UFC/g grano), levaduras ($10^6 - 10^7$ UFC/g grano) (Lynch et al., 2021), y los microorganismos productores de EPS, que podrían ser responsables del crecimiento del grano, como *L. nagelii*, *L. hordei*, *L. satsumensis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. casei*, (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Pendón et al., 2022). Se considera a *L. hilgardii* como el principal productor de polisacáridos insolubles en el grano de kéfir, sin embargo, cuando esta bacteria no está presente, otros productores de dextrano deben asumir ese rol (Lynch et al., 2021). A través de técnicas de biología molecular se han identificado especies bacterianas como *L. kefirii*, *L. parabuchneri*, *Acetobacter lovaniensis*, *Bifidobacterium aquikefirii*; y levaduras como *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *Dekkera bruxellensis*. Tanto en las bebidas de kéfir como en los granos, se ha reportado la presencia de *Phylum Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022; Pendón et al., 2022).

Sacarosa

La sacarosa, generalmente añadida como azúcar morena, es la fuente de carbono más utilizada en la fermentación del kéfir de agua. Las soluciones de miel y agua de melaza de uva también son buenos medios alternativos debido a sus efectos positivos sobre el crecimiento de los granos de kéfir y sus propiedades sensoriales. Cuando la sacarosa se sustituye gradualmente por glucosa y fructosa, se observa una disminución en las tasas de producción volumétrica de etanol, ácidos láctico y acético, y glicerol. Sin embargo, la glucosa se fermenta más rápido que la fructosa y se prefiere como sustrato alternativo a la sacarosa (Pendón et al., 2022). Si bien el azúcar es la fuente más utilizada, debido a la buena capacidad de los microorganismos de los granos de kéfir para adaptarse a diferentes sustratos, la bebida se ha reportado la producción de kéfir de agua con diferentes sustratos de azúcar incluyendo melaza de caña, azúcar demerara y azúcar moreno, así como otras fuentes alternas de azúcar como coco (*Cocus nucifera*) (Tavares et al., 2023). Como opción para dar valor agregado a subproductos agroindustriales, se ha propuesto el uso de bagazo y cáscaras de frutas, entre otras materias primas, como fuente de azúcares fermentables para la producción sustentable de kéfir; sin embargo, aún se necesitan estudios adicionales para demostrar su viabilidad, dado que el uso de estos sustratos puede conducir a la generación de otros compuestos metabólicos, alterando las características sensoriales y propiedades biológicas de la bebida (Moretti et al., 2022).

Frutas

El uso de frutas modifica la fermentación y la tasa de producción de ácido láctico y acético, así como también el contenido de nutrientes y las características del producto final (Pendón et al., 2022). De manera habitual, los higos frescos o secos parecen ser los frutos más utilizados, sin embargo, también se han empleado frutas secas, como pasas, dátiles y

ciruelas (Laureys et al., 2022). El uso de higos secos también influye en el contenido de calcio en la fermentación, lo que a su vez, promueve el aumento de masa, como ya se mencionó antes, para la síntesis de dextrano se requiere de la enzima glucano-sacarasa que requiere calcio para operar, por lo que su presencia puede mejorar significativamente el crecimiento del grano (Lynch et al., 2021).

pH

Cuando el pH es significativamente bajo se observa una disminución en el crecimiento del grano, ya que se inhibe la producción de las glucano-sacarosas lo que evita la formación de glucano (Laureys et al., 2022; Lynch et al., 2021).

Oxígeno

La disponibilidad de oxígeno afecta la composición química del producto final ya que las condiciones aeróbicas favorecen la proliferación de bacterias ácido-acéticas, lo que aumenta la concentración de ácido acético y disminuye los niveles de etanol, por el probable consumo de este metabolito por estas bacterias (Pendón et al., 2022).

Producción del kéfir de agua

La metodología general para la producción de kéfir de agua se ilustra en la Figura 1. Primero se prepara un medio de sacarosa con o sin frutas secas o extractos de frutas; se añaden los granos de kéfir y se incuban a 21°C por 2-3 días (Tabla 1). Después de la fermentación, los granos se separan del medio por filtración, se lavan, se secan y se mantienen en un tanque de refrigeración hasta la próxima inoculación; esencialmente pueden reutilizarse *ad infinitum*. Es importante mencionar que el uso de cultivos iniciadores definidos no es común en la elaboración de kéfir de agua de forma artesanal. Dado que la regulación del proceso de producción de kéfir es incipiente, también es necesario definir muchos parámetros de calidad para el escalado de este producto (Laureys et al., 2022; Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022).

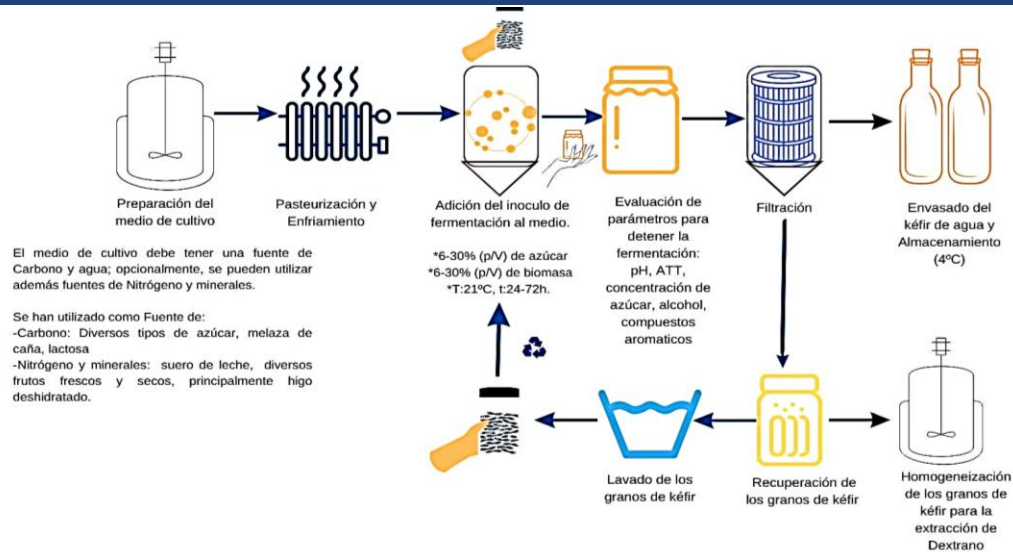


Figura 1. Diagrama de proceso general de producción del kéfir de agua

Fuente: Elaboración propia con información de: Guzel-Seydim, Gökırmaklı, & Greene, (2021); Laureys, Leroy, Vandamme, & De Vuyst, (2022); Lynch, Wilkinson, Daenen, & Arendt, (2021); Moretti et al., (2022); Zannini et al., (2023).

Existe una interrelación entre la composición del medio, las condiciones de fermentación, la composición microbiana, la cinética y los productos de fermentación del kéfir de agua resultante. Por lo tanto las características de cada proceso de fermentación dependen de la selección específica de los sustratos utilizados (Safak et al., 2023; Zannini et al., 2023).

Producción de exo-polisacáridos (EPSs) a partir de la biomasa de kéfir

El kéfir de agua contiene una cantidad elevada de bacterias productoras de EPSs; la fracción exo-polisacárida del kéfir de agua contiene principalmente dextranos, con una composición estructural y pesos moleculares variables. Los dextranos del kéfir de agua están unidos principalmente en la posición O₃ y O₂; además, en la bebida se encuentran trazas de levanos. Por su parte, los granos de kéfir están compuestos por dextranos ramificados en la posición O₃, preferentemente. Comparados con la bebida, los granos contienen una porción elevada de unidades de glucosa con enlaces 1,3. Los análisis de metilación y la huella enzimática han demostrado que los dextranos en los granos de kéfir y en la bebida contienen cantidades variables de los mismos elementos estructurales y consecuentemente pueden ser producidos por diferentes microorganismos (Fels et al., 2018).

Las BAL (principalmente *L. hilgardii*), son conocidas por producir diferentes tipos de dextrano, que se clasifican en dextrano insoluble y soluble de acuerdo con sus enlaces y la presencia o ausencia de ramificaciones. Los granos de kéfir de agua (como sus productos fermentados) están constituidos casi en su totalidad por dextranos ramificados a los cuales se les atribuye su nula solubilidad. Es posible que incluso dentro de un mismo grano, existan diferentes tipos de dextranos, aunque se ha probado también que su estructura no se ve afectada por la composición del medio (Lynch et al., 2021; Pendón et al., 2022).

La producción de dextrano aparente ser una adaptación del nicho microbiológico a un entorno alto en sacarosa; los EPSs se producen extracelularmente por la acción de una enzima secretada conocida como glucano sacarasa, que puede ser liberada en el medio o retenida en la célula (Lynch et al., 2021). La síntesis de dextrano por *L. Hilgardii* se produce por una glucano- sacarasa extracelular (T: 40°C, pH: 4.3–4.6) que se activa cuando el pH disminuye durante el crecimiento bacteriano, pero se inactiva si el pH sigue disminuyendo (pH~3) o a bajas concentraciones de calcio, ya que las glucano-sacarosas tienen una región de unión al calcio cerca de su centro activo. De esta manera, valores bajos de pH producen granos pequeños con alta concentración microbiana (Lynch et al., 2021; Pendón et al., 2022).

El crecimiento del grano reviste gran importancia, ya que un desarrollo insuficiente limita la producción exitosa del kéfir; sin embargo, la generación de excedentes de los granos posibilita su utilización para obtener nuevos biomateriales con aplicaciones industriales. En la Figura 2 se resumen gráficamente los factores que influyen en el crecimiento de la biomasa de kéfir. Como ya se mencionó, el pH, la concentración de calcio, la viabilidad y tipo de sustratos y nutrientes, la temperatura y el tiempo de fermentación pueden influir en la actividad de las glucano-sacarosas, afectando la tasa de biosíntesis (Pendón et al., 2022; Zannini et al., 2023). Además, es importante considerar las

características intrínsecas del inóculo; si bien el incremento en la biomasa ocurre durante los procesos de subcultivo (Figura 1), obtener un bajo rendimiento es un problema común que limita la producción de la bebida, la caracterización bioquímica y microbiológica del cultivo inicial y el uso posterior de los granos. Usar un inóculo de kéfir congelado, descongelado y reactivado, no incrementa la biomasa, debido al daño irreversible que se produce en el grano (Pendón et al., 2022). Por lo tanto, definir las condiciones del medio de cultivo, el origen del inóculo y la cinética de crecimiento de la biomasa es un factor clave en la producción del kéfir.

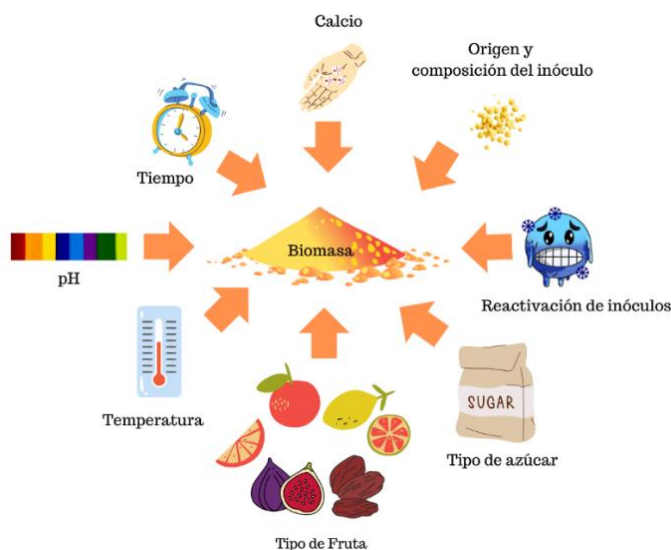


Figura 2. Factores que influyen en el rendimiento de la biomasa de kéfir
Fuente: Elaboración propia con información de Pendón et al., (2022); Zannini et al., (2023).

Extracción y caracterización tecnológica de EPSs de kéfir y su uso para elaboración de películas

El enfoque tradicional para desarrollar nuevos materiales biodegradables ha sido la purificación de biopolímeros de interés a partir de su biomasa original, en ocasiones realizando modificaciones físico químicas para mejorar su capacidad tecnológica.

Si bien, la extracción de EPSs del kéfir resulta compleja, aquellos procesos que utilizan toda la biomasa resultan más eficientes; en este sentido, el aprovechamiento de los polisacáridos de kéfir de agua se considera más eficiente tecnológicamente hablando que aquellos del kéfir de leche (Cottet et al., 2020). Se han reportado procesos de extracción de EPSs del kéfir con calor, NaOH y una precipitación final con etanol absoluto; su

caracterización estructural indica que éstos están formados principalmente por un homopolisacárido de dextrano, que tiene estabilidad térmica y fotoquímica; en cuanto a sus propiedades tecnológico funcionales se ha observado que posee aplicaciones potenciales como estabilizante de emulsiones, con excelentes propiedades adhesivas y formadoras de películas, capaces de formar geles y dispersiones viscosas a bajas concentraciones, reafirmando entonces su gran potencial para el desarrollo de productos en la industria alimentaria, biomédica, cosmética y farmacéutica (Cottet et al., 2020; Lucena et al., 2022).

Diversas publicaciones han abordado el uso de EPSs de kéfir para la elaboración de películas. En la Figura 3 se observa un diagrama de proceso simplificado elaborado

Artículos

con base en lo reportado por distintos autores (Coma et al., 2019; Cottet et al., 2020; Linares-Bravo et al., 2022). La formación de películas involucra el uso de al menos un agente formador de películas (polisacáridos o proteínas), solventes y plastificantes. De manera general, para elaborarlas se prepara un dispersante que contenga biopolímeros y luego se remueve el solvente (método de secado) con el objetivo de disminuir la separación entre los polímeros mejorando así su interacción. Esta interacción permite la formación de una red macromolecular que

forma la estructura en la película. Las propiedades de la película dependen de la estructura y la química de las cadenas poliméricas, de las condiciones de derretimiento, y de la presencia de plastificantes, los cuales son requeridos para mejorar la integridad de la película y sus propiedades mecánicas. Usualmente son pequeñas moléculas que desestabilizan los puentes de hidrógeno, disminuyen las fuerzas intermoleculares e incrementan la estabilidad y la movilidad de las cadenas poliméricas (Linares-Bravo et al., 2022).

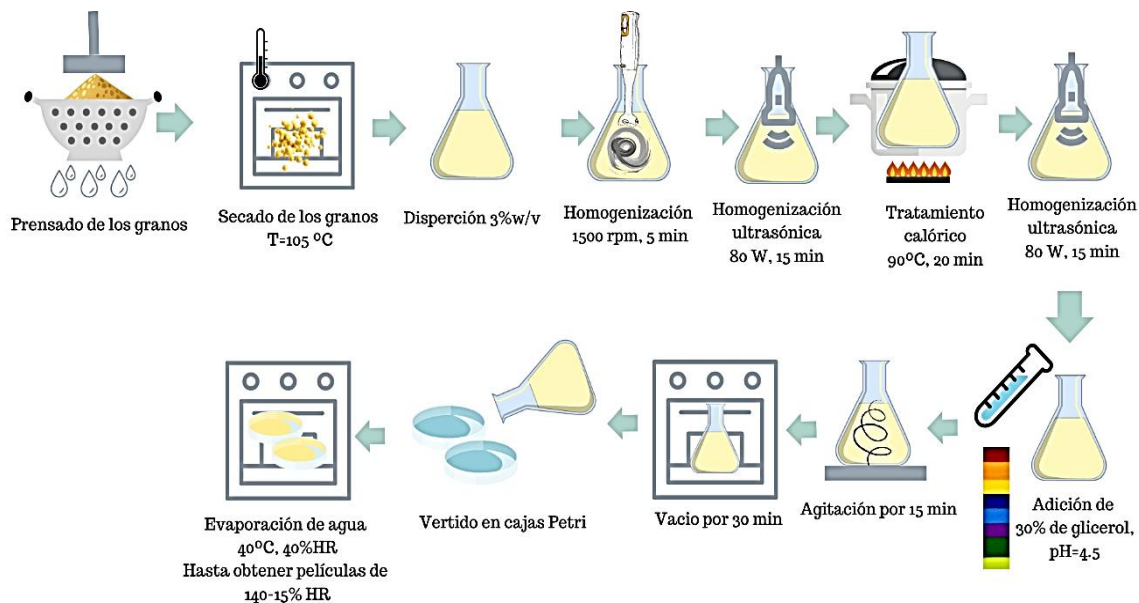


Figura 3. Diagrama de proceso simplificado con los principales pasos del proceso de recuperación de EPSs de kéfir y la formación de películas descritos en la literatura

Fuente: Elaboración propia con información de Pendón et al., 2022; Zannini et al., 2023.

El uso del dextrano a partir de la biomasa de kéfir de agua es un tema de estudio reciente. Coma et al., (2019) propusieron un sistema de extracción del dextrano utilizando toda la biomasa del kéfir de agua y estudiando el efecto de adición de distintas proporciones de glicerol como plastificante. El proceso consistió en lavar y prensar los granos, secarlos a 105°C y preparar una dispersión al 3% (peso seco) de granos de kéfir. Esta dispersión primero se homogeneizó mecánicamente (15,000 rpm, 5 min) y después se sometió a homogeneización ultrasónica (80 W, 15 min), seguida de un tratamiento térmico en baño de agua (90°C, 20 min). Después se aplicó un segundo tratamiento ultrasónico en las mismas condiciones, y se agregó el plastificante

(0,10,20,30% por peso seco de kéfir, pH final 4.5). Finalmente, las dispersiones se sometieron a vacío (30 min) para eliminar las burbujas de aire incorporadas durante el proceso. Para obtener espesores cercanos a 1 mm y 17 g en las películas, la dispersión se colocó en placas Petri de plástico (D= 8.6cm) y se evaporó el agua en un horno ventilado (40°C, 40% HR), hasta obtener un contenido residual de agua en las películas de 10 a 15%. El uso del plastificante al 30% permitió obtener películas flexibles y fáciles de manipular. Este mismo procedimiento fue retomado más tarde por Linares-Bravo et al., (2022), con la finalidad de comparar las propiedades fisicoquímicas de las películas de kéfir con las películas convencionales obtenidas a partir de almidones de taro y yuca. Los resultados de

caracterización reológica, dureza y A_w (<0.6) fueron similares. Las películas de kéfir mostraban continuidad, uniformidad y alta transparencia sin grietas, por lo que pueden representar una alternativa atractiva para reemplazar a los materiales convencionales.

Uso de películas a base de kéfir

Se han realizado diversos estudios sobre la caracterización y las propiedades de películas elaboradas a partir de biomasa de kéfir de agua, utilizando diferentes composiciones. El uso directo de la biomasa sin un proceso de extracción exhaustivo del dextrano es una característica común en varios procedimientos; en este tenor, Coma et al., (2019) elaboraron películas con 3% (p/p) de kéfir en base seca, añadiendo glicerol en diferentes concentraciones (0,10,20,30%) como plastificante, reportando que el glicerol al 30% en peso permitía obtener películas homogéneas, continuas, sin grietas, uniformes y de alta transparencia. La presencia del plastificante tuvo un efecto en las propiedades térmicas, disminuyendo la temperatura de transición vítrea (T_g) de las muestras, en las propiedades mecánicas al obtenerse películas más flexibles, de gran elasticidad y fáciles de manipular con un grosor aproximado de 6×10^{-5} m, así como también en la cantidad de agua de hidratación y la permeabilidad al vapor de agua. Por otra parte, Linares-Bravo et al., (2022) compararon películas a base de kéfir con películas convencionales de almidón extraído de taro y yuca. Las primeras mostraron flexibilidad, elasticidad, continuidad, uniformidad y alta transparencia sin grietas, mientras que las elaboradas con almidones exhibían una mayor dureza y por lo tanto eran quebradizas, concluyendo que los granos de kéfir de agua tienen potencial para ser utilizados en el desarrollo de nuevos materiales biodegradables, como una alternativa a las fuentes comunes de películas comestibles.

También se ha estudiado el uso de otros polímeros y nanocompuestos en la formulación, Marinho et al., (2023) utilizaron la siguiente formulación: 1.5% (p/v) quitosano 0.3% (p/v) granos de kéfir de agua, 2% (p/v) A. acético, 0.45% (p/v) glicerol, 3% de SiO_2 obteniendo películas con características uniformes, ligeramente rugosas debido a la adición de nanosilíce, con un grosor aproximado de 1.6×10^{-5} m. El uso de este

nanocompuesto también permitió mejorar la estabilidad térmica, aumentar la ductilidad sin interferir en su resistencia a la tracción. Además, las nanopartículas aumentaron la estabilidad térmica asociada a la humedad de las películas, la película de control (quitosano/kéfir de agua) experimentó una pérdida de masa del 5 % a $68.3 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que la película quitosano/kéfir de agua + 10 % SiO_2 mostró la misma reducción de masa a $75.7 \text{ }^\circ\text{C}$. En general, el uso de 3 % de SiO_2 puede ser la concentración más prometedora como alternativa sostenible para el envasado de alimentos, ya que es posible mejorar propiedades, como la resistencia a la tracción, la ductilidad y la estabilidad térmica de las películas.

Por otro lado, se ha estudiado el uso de otros compuestos de base biológica como polisacáridos, proteínas o lípidos y aditivos funcionales que permitan modificar o mejorar las propiedades del dextrano, con el objetivo de mejorar las propiedades de barrera mientras se mantienen las propiedades deseables de los alimentos. El uso de otros ingredientes en la formación de compuestos de películas comestibles brinda una amplia gama de posibilidades para modificar sus propiedades y adaptarse a los requisitos para diferentes alimentos (Zikmanis et al., 2021).

Finalmente, las películas de kéfir pueden tener distintas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica e incluso en el campo biomédico, ya que presentan una distribución uniforme de bacterias que pueden actuar para proteger heridas contra microorganismos patógenos (Linares-Bravo et al., 2022). En la industria alimentaria, estas películas biodegradables pueden ser funcionales, actuando como agentes antimicrobianos o antioxidantes (Coma et al., 2019), pudiendo utilizarse para el empaque de alimentos y el empaque activo (Cottet et al., 2020).

Prospectiva

La demanda actual de los consumidores de alimentos ha llevado a la industria alimentaria y de embalaje a enfrentar varios desafíos, el primero esta relacionado con la conservación de alimentos para prolongar la vida útil de los mismos, sin alterar sus propiedades originales, y sin el uso excesivo de aditivos; el segundo es la búsqueda de la generación de

procesos sostenibles reduciendo la producción de desechos debido al uso de envases convencionales a base de petróleo. Cabe destacar como un enfoque muy deseable la sustitución de los polímeros sintéticos por materiales biodegradables (Galus et al., 2020). El uso de películas y recubrimientos comestibles desarrollados a partir de biopolímeros alimentarios han avanzado significativamente durante los últimos años (Kumar et al., 2022).

Se han investigado varios materiales novedosos para ser utilizados en la producción de películas y recubrimientos comestibles. La fuente de donde se obtienen estos biomateriales, generalmente biopolímeros, es un factor muy importante que influye en las propiedades funcionales finales de los recubrimientos (Galus et al., 2020). El uso del dextrano generado a partir del kéfir de agua es un tema de investigación reciente, que no se ha explorado tanto como el uso del kefirano proveniente del kéfir de leche, y cuyo proceso de extracción es más sencillo, además de que se está utilizando el excedente de biomasa generado tras la fermentación, al que comúnmente no se le da aplicación. Debido a esto, y a las propiedades funcionales únicas que tienen los EPSs del kéfir de agua, incluyendo biodegradabilidad, inocuidad, biocompatibilidad, citocompatibilidad, actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*; es que recientemente están ganando protagonismo. Desde el punto de vista tecnológico el dextrano obtenido a partir del kéfir se puede utilizar para modificar propiedades texturales, mecánicas y reológicas de productos de recubrimiento, exhibiendo capacidades estabilizantes, emulsionantes, de adherencia y de barrera al vapor de agua que son satisfactorias para usarse en la formación de biopelículas y coberturas (Díaz-Montes, 2021; Lucena et al., 2022), lo que puede dar lugar a envases adecuados y recubrimientos protectores específicos con propiedades mejoradas, que contribuirían a aumentar la vida útil y mejorar la calidad de los alimentos (Coma et al., 2019).

Como ya se ha mencionado, algunas investigaciones han desarrollado películas de dextrano puro, evaluando diferentes concentraciones y tipos de plastificantes, el desarrollo de mezclas de dextrano con otros

biopolímeros, y el uso de nano- rellenos en películas. Sin embargo, aún falta investigar sobre el desarrollo de películas a base de mezclas de dextrano con otros biopolímeros incluyendo varios tipos de proteínas, polisacáridos, lípidos y el uso de diversos nano-compuestos, así como también la aplicación de estas películas en diferentes productos. Además, el hecho de que las diferentes formulaciones de recubrimientos dependan de los factores intrínsecos y extrínsecos del alimento, hace necesario el desarrollo de investigación para caracterizar y evaluar las propiedades de los EPS del kéfir de agua y su combinación con otros ingredientes. El desarrollo de nuevas composiciones de recubrimientos y películas es complejo y requiere una elección cuidadosa de los ingredientes del recubrimiento de EPS. Dado que los diferentes materiales utilizados para la fabricación de recubrimientos y películas tienen diferentes efectos sobre la calidad del alimento que se recubre, la elección de los ingredientes del recubrimiento dependerá de los factores intrínsecos y extrínsecos involucrados, por lo tanto, los materiales de cobertura que se desarrollen para un producto pueden no ser apropiados para otro. Por ello, se requiere ahondar en la caracterización y evaluación de propiedades de EPS microbianos y su combinación con otros ingredientes (Zikmanis et al., 2021).

Si bien, los beneficios del uso de películas y recubrimientos comestibles para la industria alimentaria son numerosos, solo se han desarrollado algunas aplicaciones industriales. Debido a esto el escalamiento industrial podría ser otra línea de investigación importante, considerando y delimitando parámetros como el vapor de agua, el oxígeno, la barrera aromática, la reducción de la pérdida de peso de los alimentos y los agentes antimicrobianos y antioxidantes añadidos (Kumar et al., 2022); así como también, las propiedades mecánicas, sensoriales, funcionales, junto con los costos de procesamiento. Por lo tanto, se requiere más investigación sobre este tema existiendo un amplio campo de investigación, para poder comercializar industrialmente estos recubrimientos o películas.

Conclusiones

A diferencia de los polisacáridos vegetales que son ampliamente conocidos e investigados, el uso de EPSs sigue siendo muy limitado, especialmente para películas y recubrimientos. A lo largo de esta revisión se describió el uso de los EPSs de la biomasa del kéfir como nueva fuente de biopolímeros para el desarrollo de materiales biodegradables, que pueden utilizarse en diferentes aplicaciones específicas. Los granos de kéfir de agua representan una alternativa viable, ya que su uso involucra no solo la producción de una bebida fermentada, sino que también el excedente de biomasa puede ser utilizado como fuente de EPSs, de forma directa sin utilizar un proceso de extracción complejo. El ecosistema microbiano y los metabolitos presentes en el kéfir de agua dependen profundamente de las variables y condiciones de fermentación y, en consecuencia, los beneficios para la salud y el crecimiento del grano. Se necesitan más estudios para establecer un proceso estandarizado para la producción del kéfir de agua, el uso de iniciadores definidos, sustratos utilizados, lo que permitiría la elaboración de productos con una calidad constante. Los EPSs del kéfir no tienen la desventaja ambiental asociada a los polímeros sintéticos, el cultivo de los granos resulta sencillo, y barato, además de que no se requieren técnicas complejas de extracción y tienen propiedades tecno-funcionales interesantes para la industria química y alimentaria, como su uso para la formación de películas y recubrimientos, debido a su adhesividad, uniformidad, continuidad y alta transparencia sin la formación de grietas por lo que estas películas representan una alternativa atractiva capaz de reemplazar los materiales convencionales.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología, CONAHCYT, por su apoyo con la beca recibida para la estancia posdoctoral.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, BUAP, por brindar sus instalaciones y el acceso a las bases de datos necesarias para la realización de este trabajo.

Referencias

Coma, M. E., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2019). Water kefir grains as an

innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal*, 120(September), 109234.

<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>

Cottet, C., Ramirez-Tapias, Y. A., Delgado, J. F., de la Osa, O., Salvay, A. G., & Peltzer, M. A. (2020). Biobased materials from microbial biomass and its Derivatives. *materials*, 13(1263), 26.

<https://doi.org/doi:10.3390/ma13061263>

Díaz-Montes, E. (2021). Dextran : Sources , Structures, and Properties. *Polysaccharides*, 554–565.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033>

Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *189(February)*, 296–303.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>

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>

Laureys, D., Leroy, F., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2022). Backslopping Time, Rinsing of the Grains During Backslopping, and Incubation Temperature Influence the Water Kefir Fermentation Process. *Frontiers in Microbiology*, 13(May), 1–12.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.871550>

Linares-Bravo, P., Cabo-Araoz, S. D., Luna-Solano, G., Urrea-García, G. R., & Cantú-Lozano, D. (2022). Obtention of New Edible Biofilms from Water Kefir Grains in Comparison with Conventional Biofilms from Taro (*Colocasia esculenta*) and Cassava (*Manihot esculenta*) Starch. *Processes*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/pr10091804>

Lucena, M. A., Ramos, I. F. D. S., Geronço, M. S., de Araújo, R., da Silva Filho, F. L., da Silva, L. M. L. R., de Sousa, R. W. R., Ferreira, P. M. P., Osajima, J. A., Silva-Filho, E. C., Rizzo, M. D. S., Ribeiro, A. B., da

Artículos

Costa, M. P. (2022). Biopolymer from Water Kefir as a Potential Clean-Label Ingredient for Health Applications: Evaluation of New Properties. *Molecules*, 27(12). <https://doi.org/10.3390/molecules27123895>

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(March). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>

Marangoni Júnior, L., Vieira, R. P., & Anjos, C. A. R. (2020). Kefiran-based films: Fundamental concepts, formulation strategies and properties. *Carbohydrate Polymers*, 246(May), 116609. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116609>

Marinho, C. O., Marangoni Júnior, L., Cecci, R. R. R., & Vieira, R. P. (2023). Blends of Chitosan and Water Kefir Grain Biomass Incorporated with Nanosilica. *Coatings*, 13(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/coatings13020465>

Moretti, A. F., Moure, M. C., Quiñoy, F., Esposito, F., Simonelli, N., Medrano, M., & León-Peláez, Á. (2022). Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods*, 5(November 2021), 100123. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>

Muhialdin, B. J., Zawawi, N., Abdull Razis, A. F., Bakar, J., & Zarei, M. (2021). Antiviral activity of fermented foods and their probiotics bacteria towards respiratory and alimentary tracts viruses. *Food Control*, 127(December 2020), 108140. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108140>

Pendón, M. D., Bengoa, A. A., Iraporda, C., Medrano, M., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2022). Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 162–180. <https://doi.org/10.1111/jam.15385>

Tavares, P. P. L. G., Mamona, C. T. P., Nascimento, R. Q., dos Anjos, E. A., de Souza, C. O., Almeida, R. C. D. C., Mamede, M.E.D.O., Magalhães-Guedes, K. T. (2023). Non-Conventional Sucrose-Based Substrates: Development of Non-Dairy Kefir Beverages with Probiotic Potential. *Fermentation*, 9(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040384>

Zannini, E., Lynch, K. M., Nyhan, L., Sahin, A. W., O' Riordan, P., Luk, D., & Arendt, E. K. (2023). Influence of Substrate on the Fermentation Characteristics and Culture-Dependent Microbial Composition of Water Kefir. *Fermentation*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation9010028>

Zikmanis, P., Juhņeviča-Radenkova, K., Radenkova, V., Segliņa, D., Krasnova, I., Kolesovs, S., Orlovskis, Z., Šilaks, A., Semjonovs, P. (2021). Microbial Polymers in Edible Films and Coatings of Garden Berry and Grape: Current and Prospective Use. *Food and Bioprocess Technology*, 14(8), 1432–1445. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02666-3>